

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; HAZIME MASAMUNE, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI EHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUUJI SUYEOSHI, Tokyo, MASAJI TOMITA, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

Reprinted by
TOA BOOK EXPORTS, INC.

Tokyo Kosho Kaikan Building
Kanda Ogawa-cho 3-22, Tokyo
CABLE: Toaperiodical, Tokyo
PHONE: Tokyo 291-1448

BEITRÄGE ZUR EMBRYOCHEMIE DER AMPHIBIEN. VIII.

Oxydationsvorgänge im Riesensalamanderei.

VON

FUJITO YAMASAKI.

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen Fakultät
zu Nagasaki. Ausgeführt unter Leitung von Prof. M. Tomita.)*

(Eingegangen am 10. Februar 1935)

Das heterogene, chemische System der Zellen ist durch seine grosse Reaktionsfähigkeit ausgezeichnet. Zwar ist es möglich, dass bei dieser Reaktionsfähigkeit die Heterogenität des Protoplasmas eine Rolle spielt, indem sie besondere, die chemischen Reaktionen beschleunigende und regulierende Verhältnisse schafft. Indessen ist es wahrscheinlich, dass der chemische Charakter der die Zellen konstituierenden, einfachen Stoffe für die Reaktionsfähigkeit die wichtigste Rolle spielt. Die weitaus wichtigsten chemischen Reaktionen, die im Körper der höheren Tiere vor sich gehen, sind die Oxydationsvorgänge, denn ein Stillstehen dieser Reaktionen hat den augenblicklichen Tod zur Folge. Ein nähere Kenntnis des Oxydationsmechanismus würde ein helles Licht auch auf all die anderen Lebensvorgänge werfen.

Es war naheliegend, an Fermente zu denken, die in irgend einer Form den Sauerstoff aktivieren bzw. auf bestimmte Verbindungen übertragen. Einige Beobachtungen gaben den Anstoss, die in den Zellen sich vollziehenden Oxydationsvorgänge als Dehydrierungen aufzufassen. Das Studium der Wirkung der verschiedenartigen Dehydrasen hat ergeben, dass es solche gibt, die Wasserstoff in einer Weise aktivieren, dass er unter Bildung von Wasserstoffsuperoxyd auf gewöhnlichen Sauerstoff übertragen werden kann. In anderen Fällen muss noch eine Aktivierung des Wasserstoffakzeptors Sauerstoff hinzukommen. Das Zytochrom

besitzt die Fähigkeit, den gewöhnlichen Sauerstoff mit dem durch Dehydrasen aktivierten Wasserstoff zur Reaktion zu bringen. Eine weitere Frage ist die, wodurch die Aktivierung des Sauerstoffs bewirkt wird. Es spricht vieles dafür, dass diese Funktion einem Fermentsystem zukommt. Es handelt sich um die sogenannte Indophenoloxydase. Eine Sulfhydrylgruppe spielt auch eine wichtige Rolle für die Reaktionsfähigkeit, insbesondere die Autoxydabilität und das Reduktionsvermögen des Protoplasmas.

Was die Oxydations-Reduktionsfermente der bebrüteten Eier betrifft, so gelangten einerseits Tomita (1929), Yaoi (1929) und Sagara (1930) zu dem Ergebnis, dass sich bei der Entwicklung sowohl von Reptilien- als auch von Vogeleiern eine Zunahme des Glutathions zeigt und andererseits hat Herlitzka (1907) das Vorkommen der Indophenoloxydase, Catalase und Peroxydase in bebrüteten Froscheiern festgestellt.

Um die Untersuchungen über die Oxydationsvorgänge bei den sich entwickelnden Eiern zu ergänzen, habe ich das Stadium der Oxydations-Reduktionsfermente im Riesensalamanderei unternommen.

Um den Gehalt des Embryos an Glutathion zu ermitteln, wurde zunächst das Versuchsmaterial auf bekannte Weise mit 10%iger Trichloressigsäure extrahiert; aus dem enteweißten Filtrat wurde das Glutathion nach Tunieliffe (1925) jodometrisch bestimmt.

Zum Nachweis der Indophenoloxydase ist die Bildung von Indophenolfarbstoff aus dem Reagens von Röhmann und Spitzer (1895) angewandt worden, was von Vernon (1912–1914) zu einer colorimetrischen Methode ausgearbeitet wurde. 0,5 g Embryo oder Perivitellinflüssigkeit werden mit 5 ccm des Reagens versetzt und eine Stunde in dünner Schicht bei Zimmertemperatur in einer Petrischale stehen gelassen. Man unterbricht durch Zusatz von 10 ccm Alkohol, der den gebildeten blauvioletten Farbstoff gleichzeitig aufnimmt. Man bestimmt den Farbstoffgehalt colorimetrisch und kann so die Oxydationskraft vergleichen.

Die in den verschiedenen Versuchen erhaltenen Ergebnisse werden in der Tabelle zusammengestellt.

Aus den angeführten Befunden ergibt sich:

TABELLE I.

Versuchsnummer	Entwicklungsstadium des Eies	Zahl der verwendeten Eier	Gefundene Menge des Glutathions im Embryo (mg)
1	Frühstadium	21	6,000
2	Mittelstadium	13	0,096
3	Endstadium	50	2,323
4	Endstadium	50	1,876
5	Endstadium	50	2,626

TABELLE II.

Entwicklungsstadium des Eies	Indophenoloxydase in d.	
	Embryo	Perivitellin-flüssigkeit
Frühstadium	+	+
Mittelstadium •	nicht bestimmt	+
Endstadium	nicht bestimmt	++

1. Bei der Entwicklung von Riesensalamandereiern zeigt sich eine Zunahme der Sulfhydrylgruppe.

2. Schon im Frühstadium der Entwicklung ist die Indophenoloxydase sowohl im Embryo als auch in der Perivitellinflüssigkeit deutlich nachweisbar.

3. Im Endstadium der Entwicklung wird die Oxydationskraft der Perivitellinflüssigkeit stärker. Im Embryo muss sie auch mit der fortschreitenden Entwicklung sich verstärken. Zur quantitativen Bestimmung der Indophenoloxydase des Embryos im Spätstadium war aber die Colorimetrie wegen der Mischfärbung nicht anwendbar.

4. In der Perivitellinflüssigkeit und im Gallert wurde die Sulfhydrylgruppe immer vermisst.

LITERATUR.

Herlitzka (1907): Zitiert in Needhams chemical embryology, Seite 1303.

- Röhmnn und Spitzer (1895): Ber. chem. Ges., 28, 567.
Sagara (1930): Zs. f. physiol. Chem., 188, 124.
Tomita (1929): Jl. of Biochem., 10, 352.
Tunnicliffe (1925): Biochem. Jl., 19, 194.
Vernon (1912-1914): Biochem. Zs., 47, 374; 51, 1; 60, 202.
Yaoi (1929): Japan medical world, 19, 194.

BEITRÄGE ZUR EMBRYOCHEMIE DER AMPHIBIEN. IX.

Über das Vorkommen des Harnstoffes und der Harnsäure im bebrüteten Riesensalamanderei.

VON

MAKOTO TAKAMATSU UND TATSUMI KAMACHI.

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen Fakultät
zu Nagasaki. Ausgeführt unter Leitung von Prof. M. Tomita.)*

(Eingegangen am 10. Februar 1935)

Vögel und Reptilien nehmen unter den Wirbeltieren durch die Art ihrer Stickstoffausscheidung eine Sonderstellung insofern ein, als nicht der Harnstoff, sondern die Harnsäure der Hauptträger des Stickstoffes in ihrem Harn ist. Es liegt offenbar eine Anpassung an die Besonderheit dieser Tierklassen vor, und zwar durch das Vorhandensein einer gemeinsamen Sammelstelle für die Ausscheidungen der Nieren. Bei Fischen, Amphibien und Säugetieren ist der Harnstoff als das wesentlichste stickstoffhaltige Stoffwechselendprodukt anzusehen.

Was nun den Chemismus der Exkretion bei den sich entwickelnden Eiern derselben betrifft, so hat man je nach der Entwicklungsstufe verschiedenartige Verhältnisse der N-Ausscheidung gefunden. Man findet in den Eizellen von verschiedenen Tieren bestimmte gemeinsame chemische Stoffe, so lange sie nicht hoch entwickelt sind. Wenn aber eine Umgestaltung in der Form bereits entwickelter Zellengebilde geschehen ist, so geht Übereinstimmung in den Funktionen vielfach Hand in Hand mit Übereinstimmung in der chemischen Zusammensetzung. Bei der späteren Hälfte der Entwicklung gibt es einen grossen Unterschied im Chemismus der N-Ausscheidung zwischen den aquatischen und terrestrischen Eiern. Nach Kamei (1927) enthält das Allantoiswasser des Hühnerembryos am 14. Bebrütungstage durchschnittlich 0,02% Harnstoff und 0,01% Harnsäure, am 17. Tage 0,05% Harnstoff und 0,02%

Harnsäure. Tomita (1929) zufolge enthält das Embryo der Meerschildkröte am 30. Bebrütungstage 0.03% Harnstoff, am 45. Tage 0.05%. Dagegen findet sich darin äusserst wenig Harnsäure.

Es kann auch keinem Zweifel unterliegen, dass bei Amphibien-eiern nicht die Harnsäure, sondern der Harnstoff als das wichtigste Stoffwechselendprodukt zu gelten hat. Unter den Amphibieneiern, die meist so klein sind, dass sie sich der genauen Untersuchung entziehen, sind die Eier des Riesensalamanders ein recht geeignetes Material für das Studium der embryonalen N-Ausscheidung.

Da es nun äusserst schwer ist, eine ausreichende Zahl von diesen Eiern zu bekommen, so blieb das Riesensalamanderei bei dem embryochemischen Studium bisher wenig berücksichtigt. Gortner (1914) wandte seine Aufmerksamkeit den Eiern von *Cryptobranchus alleganiensis* zu und gelangte zum Schlusse: „No appreciable amount of urea or uric acid is formed during embryonic growth in *Cryptobranchus*.“ Dank einem glücklichen Zufall konnten wir im vorigen Sommer ein grosses Quantum von Riesensalamanderei-eiern bekommen und haben diese bei unseren Untersuchungen über embryonale N-Ausscheidung verwendet.

Die von der umhüllenden Gallerte abgetrennten Eier wurden mit Alkohol versetzt, der Rückstand wiederholt in Alkohol aufgenommen. Die alkoholischen Auszüge wurden eingedampft, in Wasser gelöst, ein aliquoter Teil davon für die Bestimmung des Harnstoffes entnommen. Der in Alkohol unlösliche Rückstand wurde mit Äther behandelt und die getrocknete pulverige Masse mit der 5 fachen Menge 0,01% Lithiumcarbonatlösung im Wasserbade digeriert. Nach Erkalten wurde das Gemisch mit dem 3 fachen Volumen 3%iger Uranylacetatlösung versetzt. Man fügte dem eingeeengten Filtrate Dinatriumphosphatlösung zu, um den Uranüberschuss zu beseitigen. Das Filtrat wurde dann mit dem Ludwig-Salkowskischen Reagens versetzt, der Niederschlag mit schwach ammoniakalischem Wasser ausgewaschen und in Wasser suspendiert. Man fügte dann 4–5 ccm einer 1% Kupfersulfatlösung hinzu, säuerte mit einigen Tropfen Salzsäure an, sättigte die Flüssigkeit mit Schwefelwasserstoff, erhitzte zum Sieden, erhielt sie einige Minuten im Sieden, filtrierte und wusch mit heissem

Wasser aus. Das Filtrat wurde auf wenige Kubikzentimeter eingengt und in dieser Lösung die Harnsäure nach Folin (1913 und 1922) colorimetrisch bestimmt.

Der Harnstoff wurde nach Fosse (1913) als Dixanthylharnstoff gravimetrisch ermittelt. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Ergebnisse.


TABELLE I.

Bebrütungs- dauer in Wochen	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht der Eier g	Menge des Harnstoffes		Menge der Harnsäure	
			g	%	mg	mg/100g
I-II	226	666,9	0,0317	0,0047	0,0013	0,0002
II-III	332	1347,9	0,0405	0,0030	0,0052	0,0004
III-IV	133	466,5	0,0181	0,0038	0,0044	0,0009

Es ergibt sich, dass die Menge des im bebrüteten Riesensalamanderei vorhandenen Harnstoffes im Vergleich zu dem Hühner- und Meerschildkrötenei sehr gering ist. Die Harnsäure ist nur spurenweise vorhanden.

LITERATUR.

- Folin (1919 und 1922): JI. of Biol. Chem., **38**, 459.
 Gortner, R. A. (1914): JI. of Amer. Chem. Soc., **36**(II), 1556.
 Kamei, T. (1927): H-S., **171**, 101.
 Tomita, M. (1929): JI. of Biochem., **10**, 351.



Digitized by the Internet Archive
in 2024

ZUR KENNTNIS DES KALK-UND PHOSPHORSTOFF- WECHSELS IM HÜHNEREMBRYO.

VON

TATSUMI KAMACHI.

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen Fakultät
zu Nagasaki. Ausgeführt unter Leitung von Prof. M. Tomita.)*

(Eingegangen am 10. Februar 1935)

Wo überhaupt Organisation und Zellbildung stattfindet, da müssen notwendigerweise anorganische Salze mitwirken. Calcium und Phosphor zeigen dabei eine spezifische Wirkung. Mit dem Kalk- und Phosphorstoffwechsel und deren Wirkungen im Körper sind zwei grosse Probleme verknüpft: die Beteiligung des Kalks und Phosphors am Aufbau des Knochengerüstes und deren Bedeutung für die Erhaltung und Regulation der normalen Erregbarkeit der Gewebe.

Der Kalk wird in der Nahrung entweder in Form organischer Verbindungen aufgenommen oder als anorganisches Salz. So gelangt er mit dem Trinkwasser bzw. dem Mineralbrunnenwasser in den Körper. Beide Kalkarten sind resorbierbar, wenn vielleicht auch nicht in gleicher Ausgiebigkeit. Die Resorptionsgrösse hängt zum Teil auch davon ab, welche anderen Salze gleichzeitig mit der Nahrung aufgenommen werden. Die engsten Beziehungen bestehen vor allem aber zwischen Kalk- und Phosphorstoffwechsel.

Der Phosphor kommt in den Gewebssäften des Körpers und namentlich in den Knochen in organischer Form als Calcium- und Magnesiumphosphat vor, aber daneben in organischer Bindung in den Proteiden, im Nuklein und Lecithin und in den Phosphatiden. In der Nahrung wird der Phosphor stets in hochoxydiertem Zustande eingeführt, zum kleineren Teile in Form von phosphorsauren Salzen, zum grösseren Teile in organischen Bindungen, welche letztere sämtlich mehr oder minder komplizierte esterartige Derivate der Phosphorsäure sind. Die Überlegenheit des organischen Phosphors über den anorganischen für Wachstum und

Ernährung haben am klarsten die Versuche von Cronheim und Müller (1903) erwiesen, welche der gewöhnlichen Nahrung eine Zulage von Eidotter beigaben.

Es ist das grosse Verdienst von Karashima (1928) und Iseki (1930), durch eine Reihe gründlicher Untersuchungen, welche die Eientwicklung der ausserhalb einer mütterlichen nutritiven Sphäre heranwachsenden Tierklassen betreffen, zur Erforschung des Kalk- und Phosphorstoffwechsels den Weg bereitet zu haben. Ihre Forschungen haben ergeben, dass im späteren Stadium der Bebrütung von Hühner- und Reptilieneiern eine beträchtliche Vermehrung des Kalks stattfindet, und dass dabei die Schale teilweise abgebaut und zum Aufbau des Embryos verwendet wird. Sie haben weiter konstatiert, dass die anorganische Phosphorsäure während der Eientwicklung in bedeutendem Masse zunimmt, und dass als Phosphorquelle die organischen Phosphorverbindungen dienen.

Um einen Beitrag zur Kenntnis der Resorptionsfähigkeit und Ausgiebigkeit des Kalks und Phosphors im sich entwickelnden Embryo zu liefern, habe ich auf Veranlassung von Herrn Prof. Tomita seine Injektionsmethode (1921) angewandt, die sich bereits bei verschiedenen embryochemischen Untersuchungen vorzüglich bewährt hat. In dieser Mitteilung berichte ich über den Einfluss, den eine Zugabe von Chlorecalcium, Natriumphosphat und Yatonin zum Weissei auf den Kalk- und Phosphorstoffwechsel bei der Bebrütung des Hühnereies ausübt.

Das Experiment geschieht in folgender Weise: in das spitze Ende frischer Hühnereier wird ein ganz kleines Loch gebohrt und eine abgemessene Menge der obengenannten Substanzen eingespritzt. Man schliesst sodann das Loch mit paraffiniertem Papier und lässt die Eier im Brutschrank stehen. Nach bestimmten Fristen sprengt man die Eischale und prüft die Eientwicklung. Für die Untersuchung kommen nur Eier in Betracht, die eine normale Entwicklung des Embryos zeigen. Bei der Analyse der Asche wurde das Allantoiswasser von den anderen Teilen abgetrennt und für sich besonders bearbeitet. Die wichtigsten Stoffwechselprodukte und die gelösten Mineralstoffe des wachsenden

Hühnerembryos, welche bei allen erwachsenen Tieren meist im Harn auftreten, werden in die Allantoisflüssigkeit eliminiert. Wenn man also die Menge des Kalks und Phosphors im Allantoiswasser genau bestimmt, so kann folglich die Assimilation der injizierten Stoffe im werdenden Embryo leicht festgestellt werden.

Zu den Versuchen verwendete ich immer je 1 Ei und für jede Versuchsreihe wurden 7 Versuche unternommen. Die einzelnen Versuchsergebnisse stimmen ziemlich gut miteinander überein.

1. Versuchsreihe (Kontrollversuche)

Allantoiswasser und Embryo mit Adnexen von 13 und 17 Tage lang bebrüteten Hühnereiern werden gesondert auf Kalk und Phosphor verarbeitet. Die Resultate sind in Tabelle I u. II zusammengestellt.

TABELLE I.
13 Tage lang bebrütete Eier.

Versuchs- nummer	Gesamt-Asche(g) in		P ₂ O ₅ (g) in		CaO(g) in	
	Embryo mit Adnexen	Allantois- wasser	Embryo mit Adnexen	Allantois- wasser	Embryo mit Adnexen	Allantois- wasser
1	0,4112		0,2015		0,1580	
2	0,5066		0,2548		0,1880	
3	0,4911		0,2581		0,2060	
4	0,4692	0,1870	0,2383	0,0147	0,1320	0,0168
5	0,4902		0,2465		0,1240	
6	0,4334		0,2238		0,1740	
7	0,3872		0,2130		0,0940	
	0,4555	0,0267	0,2337	0,0021	0,1537	0,0024

2. Versuchsreihe.

Das Weiss von mittelgrossen frisch befruchteten Hühnereiern wird auf bekannte Weise mit je 0,1 ccm CaCl₂-Lösung (= 0,0144 g CaO) versetzt und im Brutschrank bebrütet. Nach 13- und 17 tägiger Bebrütung werden die Eischalen in der Gegend der Luftkammer zerlöchert, über die Hälfte des Eies mit der Pinzette

TABELLE II.
17 Tage lang bebrütete Eier.

Versuchs- nummer	Gesamt-Asche(g) in		P ₂ O ₅ (g) in		CaO(g) in	
	Embryo mit Adnexen	Allantois- wasser	Embryo mit Adnexen	Allantois- wasser	Embryo mit Adnexen	Allantois- wasser
1	0,5116		0,2383		0,3080	
2	0,5150		0,1992		0,3260	
3	0,5826		0,2618		0,3040	
4	0,6026	0,0869	0,2485	0,0455	0,3700	0,0161
5	0,6108		0,2409		0,3860	
6	0,5644		0,2231		0,3240	
7	0,5870		0,2288		0,3780	
	0,5794	0,0124	0,2343	0,0065	0,3422	0,0023

ausgeschält und die Schalenhaut dann sehr behutsam mit einer Schere durchgeschnitten. Mit einer Spritze kann das Allantoiswasser quantitativ fast ganz aufgesogen werden. Von einem normal entwickelten Ei werden das Allantoiswasser und die anderen Teile gesondert auf Kalk und Phosphor verarbeitet. Die Ergebnisse gehen aus Tabelle III-IV hervor.

TABELLE III.
13 Tage lang bebrütete Eier.

Versuchs- nummer	Gesamt-Asche(g) in		P ₂ O ₅ (g) in		CaO(g) in	
	Embryo mit Adnexen	Allantois- wasser	Embryo mit Adnexen	Allantois- wasser	Embryo mit Adnexen	Allantois- wasser
1	0,4756		0,1851		0,1380	
2	0,4720		0,1857		0,1540	
3	0,4752		0,1914		0,1240	
4	0,4550	0,2258	0,1946	0,0273	0,1280	0,0154
5	0,4250		0,2041		0,1220	
6	0,4704		0,2130		0,1320	
7	0,4156		0,2307		0,1290	
	0,4498	0,0322	0,2006	0,0039	0,1328	0,0022

TABELLE IV.
17 Tage lang bebrütete Eier.

Versuchs- nummer	Gesamt-Asche(g) in		P ₂ O ₅ (g) in		CaO(g) in	
	Embryo mit Adnexen	Allantois- wasser	Embryo mit Adnexen	Allantois- wasser	Embryo mit Adnexen	Allantois- wasser
1	0,4972		0,1470		0,2320	
2	0,4944		0,1927		0,2200	
3	0,4486		0,2056		0,2240	
4	0,5088	0,1420	0,1952	0,0301	0,2520	0,0154
5	0,5264		0,1927		0,2380	
6	0,5276		0,2613		0,2360	
7	0,5466		0,2123		0,2360	
	0,5071	0,0203	0,2011	0,0043	0,2340	0,0022

Vergleicht man die in Tabelle III–IV eingetragenen Mittelwerte des Kalks und Phosphors mit denjenigen in Tabelle I–II, so fällt auf, dass beide Stoffe im Hühnerembryo bei der Chlorcalciuminjektion eine geringfügige Abnahme erfahren.

3. Versuchsreihe.

Diesmal wurde frisch befruchteten Hühnereiern je 0,1 ccm Na₂HPO₄ Lösung (= 0,00304 g P₂O₅) injiziert. Zu den Versuchen wurde jedesmal Material verwendet, das von 13 und 17 Tage bebrüteten und normal entwickelten Hühnereiern herrührte.

Tabelle V und VI veranschaulichen die Resultate.

Vergleicht man nun diese Daten mit denen der Tabelle I–II, so lässt sich nicht verkennen, dass der Gehalt des 13 und 17 Tage alten Embryos an Kalk und Phosphor bei der Natriumphosphatinjektion etwas abnimmt.

4. Versuchsreihe.

Vergleichsweise seien hier einige Injektionsversuche mit einer organischen Kalk- und Phosphorverbindung angeführt. Yatokonin ist ein von mehreren Autoren bei Drüsentuberkulose angeprie-

TABELLE V.
13 Tage lang bebrütete Eier.

Versuchs- nummer	Gesamt-Asche(g) in		P ₂ O ₅ (g) in		CaO(g) in	
	Embryo mit Adnexen	Allantois- wasser	Embryo mit Adnexen	Allantois- wasser	Embryo mit Adnexen	Allantois- wasser
1	0,4146		0,1432		0,1400	
2	0,4556		0,1118		0,1300	
3	0,4642		0,2415		0,1160	
4	0,4732	0,2506	0,2548	0,0273	0,1340	0,0203
5	0,4486		0,1902		0,1280	
6	0,4546		0,1825		0,1560	
7	0,4714		0,2180		0,1320	
	0,4546	0,0358	0,2003	0,0039	0,1337	0,0029

TABELLE VI.
17 Tage lang bebrütete Eier.

Versuchs- nummer	Gesamt-Asche(g) in		P ₂ O ₅ (g) in		CaO(g) in	
	Embryo mit Adnexen	Allantois- wasser	Embryo mit Adnexen	Allantois- wasser	Embryo mit Adnexen	Allantois- wasser
1	0,5068		0,2459		0,2160	
2	0,5103		0,2231		0,2240	
3	0,5446		0,2738		0,2480	
4	0,4744	0,1643	0,2180	0,0231	0,1940	0,0231
5	0,5426		0,1825		0,2320	
6	0,5176		0,2090		0,2000	
7	0,5026		0,2003		0,2320	
	0,5141	0,0234	0,2218	0,0033	0,2208	0,0033

senes Medikament und es wurde von der Fabrik als Fruktose-phosphorsaures Calcium bezeichnet. Mittलगrosse frische und befruchtete Hühnereier wurden mit je 0,1 ccm Yatokoninlösung (enthält 0,0116 g P₂O₅ und 0,0156 g CaO) versetzt und nach 13-

und 17 tägiger Bebrütung das Allantoiswasser und der Embryo mit Adnexen der normal entwickelten Eier jedesmal gesondert auf Kalk und Phosphor verarbeitet. Die Resultate der einzelnen Bestimmungen sind aus Tabelle VII–VIII ersichtlich.

TABELLE VII.
13 Tage lang bebrütete Eier.

Versuchs- nummer	Gesamt-Asche(g) in		P ₂ O ₅ (g) in		CaO(g) in	
	Embryo mit Adnexen	Allantois- wasser	Embryo mit Adnexen	Allantois- wasser	Embryo mit Adnexen	Allantois- wasser
1	0,4674		0,2390		0,1420	
2	0,4872		0,2168		0,1300	
3	0,4226		0,2409		0,1200	
4	0,4772	0,1955	0,2409	0,0147	0,1360	0,0203
5	0,5652		0,2359		0,1380	
6	0,4456		0,2295		0,1200	
7	0,4886		0,2604		0,1460	
	0,4791	0,0279	0,2378	0,0021	0,1331	0,0029

TABELLE VIII.
17 Tage lang bebrütete Eier.

Versuchs- nummer	Gesamt-Asche(g) in		P ₂ O ₅ (g) in		CaO(g) in	
	Embryo mit Adnexen	Allantois- wasser	Embryo mit Adnexen	Allantois- wasser	Embryo mit Adnexen	Allantois- wasser
1	0,4970		0,2504		0,2940	
2	0,5490		0,2776		0,2880	
3	0,5192		0,2358		0,2960	
4	0,5484	0,1218	0,2282	0,0315	0,3060	0,0231
5	0,5434		0,2434		0,3120	
6	0,5710		0,2449		0,3260	
7	0,5750		0,2669		0,3100	
	0,5432	0,0174	0,2496	0,0045	0,3045	0,0033

Tabelle VIII zeigt eine Zunahme des Phosphors im Embryo, die sich im Vergleich zum Kontrollversuche auf 0,0153 g belief.

Durch Zugabe von Yatokonin zum Weissei wird der Kalkgehalt des Embryos nicht gesteigert.

Es folgt nun eine Tabelle, die die in den verschiedenen Versuchen erhaltenen Mittelwerte an Calcium und Phosphor im Embryo mit Adnexen und im Allantoiswasser aufzeigt.

TABELLE IX.

Menge der injizierten Substanz .	Bebrütungs- dauer in Tagen	P ₂ O ₅ -Menge(g) in		CaO-Menge(g) in	
		Embryo mit Adnexen	Allantois- wasser	Embryo mit Adnexen	Allantois- wasser
Kontroll- versuche	13	0,2337	0,0021	0,1537	0,0024
	17	0,2344	0,0065	0,3422	0,0024
0,1 ccm CaCl ₂ -Lösung (0,0144 g CaO)	13	0,2006	0,0039	0,1328	0,0022
	17	0,2011	0,0043	0,2340	0,0022
0,1 ccm Na ₂ HPO ₄ -Lösung (0,00304 g P ₂ O ₅)	13	0,2003	0,0039	0,1337	0,0029
	17	0,2218	0,0033	0,2208	0,0033
0,1 ccm Yatokonin-Lösung (0,0116 g P ₂ O ₅) (0,0156 g CaO)	13	0,2378	0,0021	0,1331	0,0029
	17	0,2496	0,0045	0,3045	0,0033

Aus den dargelegten Untersuchungen kann man folgende Schlüsse ziehen:

1. Bei der Injektion von Chlorealcium, Natriumphosphat bzw. Yatokonin findet sich im Vergleich zum Kontrollversuche eine Verminderung des Kalks im Embryo. Da die Kalkausscheidung im Allantoiswasser sowohl bei den Injektionsversuchen als auch beim Kontrollversuch keine Veränderung erfährt, so deutet das Ergebnis darauf hin, dass die Injektion der obenerwähnten Substanzen einen hemmenden Einfluss auf die Kalkmobilisierung der Schale im werdenden Embryo ausübt.

2. Bei der Yatokonininjektion findet eine Vermehrung des Phosphors im Embryo statt, während beim Natriumphosphatzusatz

dies nicht der Fall ist. Es ist also wahrscheinlich, dass die organischen Phosphorsäureverbindungen als Phosphorquelle für die Skelettverkalkung des Embryos dienen.

LITERATUR.

- Cronheim und Müller (1903): Zs. f. diät. u. physik. Therapie, Bd. 6.
Iseki, T. (1930): Zs. f. physiol. Chem., **188**, 189.
Karashima, J. (1928): Jl. of biochem., **10**, 369.
Tomita, M. (1921): Biochem. Zeitschr., **116**, 15.

ZUR KENNTNIS DER HISTIDINBILDUNG AUS DEM ARGININ IM BEBRÜTETEN HÜHNEREI.

VON

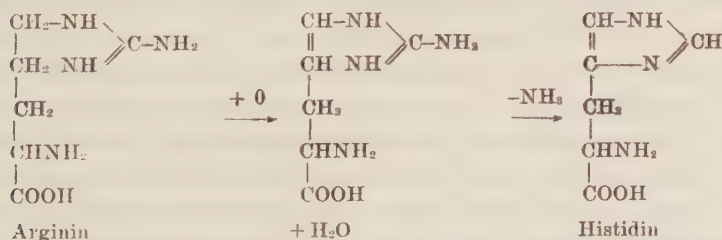
TATSUMI KAMACHI.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen Fakultät
zu Nagasaki. Ausgeführt unter Leitung von Prof. M. Tomita.)

(Eingegangen am 10. Februar 1935)

Bereits 1925 hat Y. Sendju angegeben, dass das Hühnerei bei langer Bebrütung eine geringe Verminderung der Argininmenge erfährt, während das im Hühnerei frei und gebunden vorhandene Histidin sich bei der Bebrütung mit fortschreitender Entwicklung des Embryos vermehrt. Es ist also ersichtlich, dass durch Umwandlung während der Bebrütung des Hühnereies wenigstens ein Teil des Histidin aus anderen Verbindungen herrührt.

Aus den Strukturformeln erkennt man, dass durch Aufspaltung des Imidazolrings im Histidin ein Übergang in Arginin und umgekehrt durch Ringschluss vom Guanidinkern aus ein Übergang von der letzteren Aminosäure in die erstere eingeleitet werden könnte. Hopkins (1916) war der erste, der angenommen hat, dass das Arginin durch oxydative Desaminierung unter Verlust von Ammoniak in Histidin verwandelt werden könnte.



Die Versuche mit Organen, Organextrakten und aus Zellen isolierten Fermenten können ein recht klares Bild der Umwandlung

dieser Verbindungen ergeben. Sie allein können jedoch nicht ohne weiteres einen Einblick in das Verhalten dieser Verbindungen im Zellstoffwechsel gewähren. Es ist unumgänglich notwendig, jeden einzelnen Zellvorgang unter verschiedenen Versuchsbedingungen zu verfolgen. Erst dann, wenn die Ergebnisse verschiedenartiger Versuche sich decken, darf der Schluss gezogen werden, dass eine bestimmte Art des Ablaufs von Stoffwechselvorgängen der Wirklichkeit entspricht. Es sind bei uns, um weitere Erfahrungen zu sammeln, Fütterungsversuche mittels der vorzüglich bewährten Tomitaschen Injektionsmethode im bebrüteten Hühnerei ausgeführt worden. Dabei habe ich den Einfluss verfolgt, den eine Zugabe von Histidin und Arginin zum Weissei auf die Bildung jener Basen bei der Bebrütung des Hühnereies ausübt. Die Injektionsmethode ergänzt unsere Einsicht in ausgezeichneter Weise, indem die Versuche in dem von aussen ganz getrennten Eihaushalt eine quantitative Stoffumwandlung erkennen lassen.

In das spitze Ende einer Anzahl frischer Hühnereier wurde ein ganz kleines Loch gebohrt und je 0,1 ccm 17,7%iger Argininlösung oder 0,1 ccm 4,1–6,7%iger Histidinlösung eingespritzt, worauf man die Eier im Brutschrank stehen liess. Nach 14 Tagen sprengte man die Eischale und prüfte die Eientwicklung. Um das Arginin und Histidin zu bestimmen, wurde zunächst der Embryo mit der Schere zerkleinert und der Gesamtinhalt des Eies mit Wasser durchgerührt, mit der Schenckschen Lösung versetzt, bis das Eiweiss völlig ausgefällt war. Das klare Filtrat wurde mit Schwefelwasserstoff behandelt; aus dem Filtrat von Schwefelquecksilber wurde der Schwefelwasserstoff vertrieben. Die Flüssigkeit wurde hierauf mit Soda neutralisiert und, nach dem Einengen, auf bekannte Weise mit Phosphorwolframsäure unter Zusatz von H_2SO_4 gefällt. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde durch Baryt zersetzt und der überschüssige Baryt durch Kohlensäure abgeschieden. Das Filtrat von kohlensaurem Barium wurde stark eingengt, mit Salpetersäure angesäuert und dann mit Silbernitratlösung gefällt. Dem Filtrat der Silberfällung wurde weiter solange 10%ige Silbernitratlösung zugefügt, bis eine Probe in kalt gesättigtem Barytwasser als braunes Silberoxyd sich fallen liess,

und dann wurde es mit Barytwasser im Überschuss versetzt. Das Arginin und Histidin konnte ich nach dem Verfahren von Kossel und Kutscher (1901) als Silber-Barytfällung für sich allein isolieren. Die aus der Fällung regenerierte Basenflüssigkeit wurde auf kleines Volumen eingedampft und die Stickstoffmenge nach Kjeldahl bestimmt.

Zu den Versuchen wurden jedesmal 20 normal entwickelte Eier verwendet. Die Ergebnisse finden sich in der Tabelle kurz zusammengesetzt.

TABELLE I.

Bebrütungs- dauer	Zahl der ver- wendeten Eier	Menge der injizierten Substanz g	Menge des gefundenen freien		Zu- bzw. Abnahme des freien	
			Arginins g	Histidins g	Arginins g	Histidins g
14 Tage	20	Kontroll- versuche	0,0645	0,0300		
14 Tage	20	0,3544 Arginin	0,0840	0,0360	-0,3349 ¹⁾	0,0060
14 Tage	20	0,1084 Histidin	0,0300	0,0260	-0,0345	0,1124 ²⁾

$$1) \quad 0,3544 + 0,0645 - 0,0840 = 0,3349$$

$$2) \quad 0,1084 + 0,0300 - 0,0260 = 0,1124$$

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, sieht man nach der Injektion von Arginin eine Vermehrung des freien Histidins. Die Ergebnisse stehen somit im Einklang mit den Hopkinsschen Anschauungen. Eine Steigerung des freien Arginingehalts konnte ich bei Arginin- und Histidininjektion niemals nachweisen; ja ich bemerkte sogar ein starkes Absinken des freien Arginins und Histidins. Wenn man dabei voraussetzt, dass die Gesamtmenge der freien und gebundenen Basen bei der Injektion konstant bleibt, so deuten die Abnahme des freien Arginins bei der Arginininjektion und die Kleinheit der gefundenen Menge der beiden Basen in freier Form bei der Histidininjektion darauf hin, dass einerseits das eingespritzte Arginin und Histidin zum Eiweissaufbau dienen

und andererseits die Zersetzung des Zelleiweiss durch die Injektion der genannten Basen etwas herabgesetzt wird.

Diesbezügliche Untersuchungen werden fortgesetzt.

LITERATUR.

Hopkins (1916): Biochem. Journal, **10**, 551.

Kossel u. Kutscher (1901): Zs. f. physiol. Chem., **31**, 165.

Sendju (1925): Journal of Biochem., **5**, 391.

ZUR KENNTNIS DER EMBRYOCHEMIE DES HYNوبيUS.

VON

MAKOTO TAKAMATSU.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen Fakultät
zu Nagasaki. Ausgeführt unter Leitung von Prof. M. Tomita.)

(Eingegangen am 10. Februar 1935)

Obgleich das Studium der morphologischen Entwicklung des Hynobius längst die glänzendsten Erfolge gezeitigt hat, hat doch bisher niemand Versuche über die Ausbildung der chemischen Embryologie dieses Tieres angestellt. Die Hynobiuseier liefern für das Studium des Bebrütungsvorganges ein günstiges Material, weil sie grobwahrnehmbar und verhältnismässig leicht zugänglich sind und ihre Entwicklung der grossen Durchsichtigkeit der Kapselwand wegen bis zum Ausschlüpfen der Larve Schritt für Schritt zu verfolgen ist. Nachdem wir schon ziemlich ausgedehnte chemische Untersuchungen bei der Bebrütung des Riesensalamandereies ausgeführt haben (1933–1934), kann man mit vollem Rechte erwarten, dass ähnliche Untersuchungen auch für die Hynobiuseier wertvolle Resultate liefern werden.

Manche Arten von Hynobius kommen in Japan reichlich vor. Der in hiesiger Gegend einheimische Hynobius nebulosus legt seine Eier ganz früh im Jahre ab. Der Eisack ist eine etwa 20–30 cm lange spindelförmige äussere Generalhülle, in der die durch die eigentlich Kapsel geschützten Eier von 2,3–3,2 mm Durchmesser, etwa 80–150 an der Zahl, enthalten sind. Die Eikapseln nehmen durch Imbibition von Wasser allmählich an Grösse zu, so dass sich der Eisack spannt und an dem freien Ende krümmt. Er bekommt hierdurch ein dickes strangförmiges Aussehen. Zwei Eierstränge kommen immer zusammen vor. Das eine Ende des einen Eierstranges ist mit einem Ende des anderen Stranges zusammen an irgend einen Gegenstand der Aussenwelt geklebt. Das einzelne Ei ist mit zweierlei Hüllen bedeckt, und der Raum zwischen beiden

wird von einer Gallertmasse ausgefüllt. Sie sind im frischen Zustande vollkommen durchsichtig.

Dank der liebenswürdigen Beihilfe von Herrn Dr. Yamasaki und Dr. Nakamura konnte ich in diesem Frühjahr ein reichliches Quantum von Eiern des *Hynobius nebulosus* aus der Umgebung von Kazusa (Praefektur Nagasaki) bekommen und habe diese bei den chemischen Untersuchungen verwendet.

Nach Nakamura ist der *Hynobius nebulosus* in Kazusa nicht ganz identisch mit dem in Nagasaki und so bezeichnen wir die zur Verfügung stehende Art als *Hynobius nebulosus* von Kazusa. Die Jungen dieses Tieres schlüpfen je nach der Temperatur des Wassers nach Verlauf von 5–6 Wochen aus. Zu meinen Untersuchungen verwendete ich die Eier von drei verschiedenen Entwicklungsstadien, nämlich 1–2 Wochen, 3–4 Wochen und 5–6 Wochen alte Eier.

EXPERIMENTELLE BELEGE.

I. Die Verhältniszahlen der Gewichte von Embryo (oder Dotter), Gallert und Perivitellinflüssigkeit.

Mit der fortschreitenden Entwicklung des Eies nimmt der Wassergehalt allmählich zu, während das Gewicht des Embryos und Gallerts dagegen abnimmt. Die Verhältniszahlen sind, auf 1000 Eier berechnet, in Tabelle I zusammengestellt.

TABELLE I.

Bebrütungs- dauer	Embryo		Gallert		Perivitellinfl.		Gesamt- gewicht g
	g	%	g	%	g	%	
1–2 Wochen	21,1	12,6	76,8	43,9	76,0	43,5	174,9
3–4 Wochen	21,4	9,8	59,7	27,5	136,0	62,7	217,1
5–6 Wochen	17,1	6,3	72,1	26,7	180,0	67,0	269,2

Das Gewicht des Embryos ist hauptsächlich von dem Wassergehalt abhängig. Tabelle II zeigt die Verteilung der Nährstoffe im Embryo (oder Dotter) auf 1000 Embryos (oder Dotter) berechnet.

TABELLE II.

Bebrütungs- dauer	Wasser		Org. Subst.		Anorg. Subst.		Gesamt- gewicht g
	g	%	g	%	g	%	
1-2 Wochen	19,2	86,8	2,83	12,8	0,0813	0,4	22,1
3-4 Wochen	18,2	85,0	3,04	14,2	0,1663	0,8	21,4
5-6 Wochen	14,1	82,4	2,87	16,8	0,1818	0,8	17,1

2. *Physikalische Eigenschaften der Perivitellinflüssigkeit des Eies von *Hynobius nebulosus* von Kazusa.*

Es ist schon früher im hiesigen Institut festgestellt worden, dass die physikalischen Eigenschaften der Perivitellinflüssigkeit des Riesensalamandereies denen des Wassers fast gleich sind, und dass für die Riesensalamandereier vom Anfang der Bebrütung an das Wasser ein ganz geeignetes Medium ist. Nach meinen Untersuchungen ist das Verhalten des Eies von *Hynobius nebulosus* von Kazusa ganz gleich dem des Riesensalamandereies. Tabelle III zeigt die Ergebnisse.

TABELLE III.

Bebrütungsdauer	PH	Δ	Spezifisches Gewicht
1-2 Wochen	7,0	0,000	beinahe gleich dem des Wassers
3-4 Wochen	6,9	0,001	
5-6 Wochen	6,9	0,001	

3. *Über das Verhalten der anorganischen Bestandteile bei der Bebrütung des Eies von *Hynobius nebulosus* von Kazusa.*

Die Untersuchung von Riesensalamandereiern von Iseki und Kumon (1933) haben ergeben, dass die Gesamtasche und die anorganische Phosphorsäure im letzten Entwicklungsstadium zunimmt, und dass im Gegensatz zum Hühner- und Reptilienei, der Kalkgehalt schon im früheren Entwicklungsstadium seinen Höhepunkt erreicht.

Um einen Beitrag zur Kenntnis des Mineralstoffwechsels des sich entwickelnden Embryos zu liefern, habe ich im Anschluss an

die bereits mitgeteilten Beobachtungen bei Hühner-, Reptilien- und Riesensalamandereiern den Versuch unternommen, die anorganischen Bestandteile in drei verschiedenen Entwicklungsstadien des Hynobiuseies zu verfolgen. Dabei wurden Embryo (oder Dotter) und Gallert abgetrennt und jedes für sich besonders bearbeitet.

Die quantitative Zusammensetzung der einzelnen Mineralbestandteile lässt sich aus folgender Zusammenstellung ansehen.

TABELLE IV.
Embryo (oder Dotter).

Bebrütungs- dauer in Wochen	Gehalt von 1000 Embryo (oder Dottern) an								
	Gesamt- gewicht g	Trocken- subst. g	Gesamt- asche g	P ₂ O ₅ g	CaO g	MgO g	Cl g	SO ₄ H ₂ g	SiO ₂ g
1-2	22,1	2,9226	0,0844	0,0301	0,0162	0,0090	Spur	0,0012	0,0347
3-4	21,4	2,8690	0,2863	0,0412	0,0253	0,0159	0,0070	0,0012	0,0526
5-6	17,1	2,9958	0,1820	0,0317	0,0084	0,0094	0,0154	0,0008	0,0608

TABELLE V.
1000 Gallerte verwendet.

1-2	76,8	0,3756	0,0158	Spur	0,0008	0,0025	Spur	Spur	0,0112
3-4	59,7	0,4424	0,0208	Spur	0,0012	0,0063	Spur	Spur	0,0098
5-6	72,1	0,3232	0,0248	Spur	0,0006	0,0015	Spur	Spur	6,0108

Bei Betrachtung der obigen Tabellen sieht man, dass der Aschengehalt im mittleren Entwicklungsstadium seinen Höhepunkt erreicht.

1. Über das Verhalten der N-haltigen Verbindungen bei der Bebrütung des Eies von *Hynobius nebulosus* von Kazusa.

Tichomiroff (1885) fand, dass die Menge von Guanin, Hypoxanthin u. a. während der Bebrütung der Eier von *Bombix mori* beträchtlich zunimmt. Tomita (1921) hat auch angegeben, dass die im Eierklar und im Dotter des Hühnereies vorhandenen Reststickstoffformen sich während der Bebrütung mit fortschreitender Entwicklung des Embryos vermehren. Diese Erfahrungen

wurden weiter von Nakamura (1928), Iseki und anderen (1933) auf Reptilien- und Amphibieneier ausgedehnt.

Meine Untersuchungen hatten den Zweck, die Kenntnis des Stoffwechsels der N-haltigen Verbindungen durch Untersuchung der bei der Bebrütung des Hynobiuseies obwaltenden Verhältnisse zu erweitern.

Um die Mengenverhältnisse der Reststickstoffformen gegenüber dem Gesamtstickstoff zu finden, habe ich zunächst die Gesamtstickstoffmenge des Embryos (oder Dotters) und des Gallerts auf bekannte Weise ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle VI zusammengestellt.

TABELLE VI.

Bebrütungs- dauer in Wochen	Gesamt- gewicht der 1000 Embryos (od. Dotter) g	Gehalt an			Gesamt- gewicht der Gallerte von 1000 Eiern (g)	Gehalt an	
		Trocken- subst. g	Gesamt- N mg	Rest- N mg		Trocken- subst. g	Gesamt- N mg
1-2	21,8	2,8	336,0	11,9	76,8	0,3756	46,64
3-4	21,4	3,1	308,0	29,4	59,7	0,4428	36,82
5-6	17,0	2,9	297,5	31,5	72,1	0,3242	42,64

Aus den angeführten Befunden ergibt sich, dass die Gesamt- und Reststickstoffmengen der Hynobiuseier wie beim Riesensalamanderei auffallend gering sind und dass die Reststickstoffformen sich im letzten Entwicklungsstadium vermehren.

Was das Kreatin und Kreatinin im bebrüteten Ei betrifft, so gelangten Mellanby (1907), Needham (1925), Sendju (1927), Iseki und andere (1933) zu dem Ergebnis, dass das Kreatin sich nach der Bebrütung des Hühner-, Meerschildkröten- und Riesensalamandereies mit fortschreitender Entwicklung des Embryos vermehrt, während der Kreatiningehalt fast konstant bleibt.

In Bezug auf die Harnstoff- und Harnsäurebildung bei der Entwicklung des Eies von Reptilien und Amphibien hat sich nach Tomita (1928), Takamatsu und Kamachi (1934) ergeben, dass sich eine Synthese von Harnstoff sicherlich vollzieht, während Harnsäure nicht in wesentlicher Menge gebildet wird.

Kreatin und Kreatinin des Embryos wurden nach der Enteiweissung mit Schenckscher Lösung nach Folin und Denis kolorimetrisch bestimmt. Der Harnstoff wurde mit der bekannten Xanthhydrolmethode nach Fosse (1916) ermittelt. Zur Bestimmung der Harnsäure wurde das Verfahren von Fürth und Edel (1933) angewandt.

Die Befunde sind kurz in Tabelle VII zusammengestellt worden.

TABELLE VII.

Bebrütungs- dauer in Wochen	Zahl der verwendet. Embryos (oder Dotter)	Gewicht d. verwendet. Embryos (oder Dotter) g	Gefundene Menge von			
			Kreatinin mg	Kreatin als Kreatinin berechnet mg	Harnstoff mg	Harnsäure mg
1-2	2000	43,2	0,036	0,002	2,914	0,0010
3-4	2000	43,0	0,520	0,220	2,398	0,0010
5-6	2000	34,0	0,600	0,300	1,508	0,0016

Stellt man die Resultate einander gegenüber, so findet sich im späteren Stadium eine Vermehrung des Kreatins und Kreatinins. Die Menge beider Körper ist aber sehr gering. Eine Synthese von Harnstoff vollzieht sich sicherlich, während die Harnsäurebildung sehr fraglich ist.

Dass die in freier sowie in gebundener Form vorhandenen Purin- und Hexonbasen bei der Entwicklung des Vogel- und Reptilienembryos unentbehrlich sind, ist schon im hiesigen Institut festgestellt worden. Da diese Untersuchungen ziemlich reichliches Versuchsmaterial beanspruchten, so konnten wir bisher bei den Amphibieneiern darüber keine Versuche anstellen. Ich bin dieser Frage nun beim *Hynobiusei* näher getreten. Als Untersuchungsmaterial verwendete ich bebrütete Eier von *Hynobius nebulosus* von Kazusa, die 1-2 und 3-4 Wochen alt waren.

Die Purinbasen wurden als Silbersalze gefällt und aus dem Filtrat habe ich die Hexonbasen nach Kossel und Kutscher (1901) für sich allein isoliert.

Die Ergebnisse kann man in Kürze folgendermassen zusammenfassen:

TABELLE VIII.

Bebrütungs- dauer in Wochen	Gewicht der verwendet. Embryos g	N-Menge in Purinbasen- fraktion g	N-Menge in Arginin- fraktion g	N-Menge in Histidin- fraktion g	N-Menge in Lysin- fraktion g
1-2	120	0,0031	0,0007	0,0003	0,0007
3-4	120	0,0080	0,0028	0,0017	0,0147

Aus dem angeführten Befunden ergibt sich, dass die Purin- und Hexonbasen sich während der Bebrütung mit fortschreitender Entwicklung des Embryos vermehren. Eine Zunahme von Lysinstickstoff ist dabei auffallend.

5. Über Fermente im Hynobiusei.

Wir sind berechtigt, an die Möglichkeit zu denken, dass alle tiefgehenden, chemischen Umsetzungen, welche sich in bebrüteten entwicklungsfähigen Eiern abspielen, an bestimmte Fermentwirkungen geknüpft sein könnten.

Was nun die Fermente im bebrüteten Hühnerei betrifft, so gelangten Müller und Masuyama (1900), Wohlgemuth (1905), Roger (1908), Abderhalden und Steinbeck (1910), Komori (1924) und andere zu dem Ergebnis, dass im bebrüteten Hühnerei Diastase, Lipase, Protease, Nuklease, Trypsin, Arginase und Phosphatase nachweisbar sind. Im Anschluss an diese Beobachtungen hat Sagara (1929) die Fermente im Meerschildkrötenei studiert und kam zu dem Schluss, dass sich die Quantitäten der Fermente in den verschiedenen Entwicklungsstadien und ihre Lokalisation, wenigstens in bezug auf Diastase, Lipase, Nuklease und Trypsin, bei Vogel- und Reptilieneiern ganz gleich verhalten. Andererseits hat Herlitzka (1907) die Fermentwirkung im Froschei untersucht und die Anwesenheit von Indophenoloxydase, Katalase und Amylase festgestellt. Kürzlich hat Takahashi (1934) analoge Versuche mit Eiern vom Riesensalamander angestellt und konstatiert, dass Amylase, Nuklease und Glycerophosphatase im Mittel-

stadium der Bebrütung im Embryo auftreten.

Um die Untersuchungen über Fermentwirkung bei den sich entwickelnden Eiern zu ergänzen und ferner das Verhalten bei Vogel-, Reptilien- und Amphibieneiern zu vergleichen, habe ich das Studium der Fermente im Hynobiusei unternommen. Dabei diente als Untersuchungsmaterial das Ei des *Hynobius nebulosus* von Kazusa und zwar das der letzten Periode der Bebrütung. Von den verschiedenen Fermenten wurden Amylase, Nuklease, Phosphatase, Lipase, Arginase, Urease, Sulfatase, Protease, Glykogenase und Inulase untersucht.

Die Embryos wurden von der Gallerte und der Perivitellinflüssigkeit abgetrennt, nach dem Zerreiben mit der 10 fachen Menge Wasser versetzt und die homogene Flüssigkeit wurde in 2 gleiche Portionen geteilt, wovon die eine mit der Substratlösung durchgemischt und unter Zusatz von Toluol bei 37–38° digeriert wurde. Die andere Portion wurde jedesmal unter Innehaltung identischer Bedingungen für die Kontrollversuche der bei der Autolyse von Organmaterial allein auftretenden Umsetzung verwendet. Eine gleich grosse digerierte wässrige Lösung von Substraten blieb gänglich ungespalten.

Die Ergebnisse sind in Tabelle IX kurz schematisch verzeichnet.

TABELLE IX.

Arten der Fermente	Digestionsdauer in Stunden	Embryo (mit Dotter) von Mittel- und End- Stadium der Entwicklung
Amylase	24	+
Esterase (Tributyrylase)	24	++
Trypsin	168	+
Pepsin	168	—
Nuklease	48	++
Glykogenase	72	+++
Inulase	72	+
Arginase	36	+
Urease	48	—
Glycerophosphatase	72	+++
Naphthalin-sulfatase	168	—

Aus den Versuchsergebnissen geht hervor, dass sich die Fermentwirkungen im Hynobiusei denen des Vogel- und Reptilieneies sehr ähnlich verhalten.

Für die Sammlung der Eier sage ich Herrn Dr. Shigenaga Yamasaki in Kazusa meinen besten Dank. Auch Herrn Prof. Kunitomo und Dr. S. Nakamura im hiesigen anatomischen Institut sei ergebenst für ihre Beihilfe gedankt.

LITERATUR.

- Abderhalden und Steinbeck (1910): *Zs. f. physiol. Chem.*, **68**, 312.
Fosse (1916): *Ann. de l'inst. Pasteur*, **30**, 526.
Fürth und Edel (1933): *Bioch. Zs.*, **263**, 9.
Herlitzkas (1907): Zitiert in Needhams *Chemical Embryology*, p. 1302.
Iseki und Kumon (1933): *Jl. of Biochem.*, **17**, 409.
Iseki, Kumon, Takahashi und Yamasaki (1933): *Jl. of Biochem.*, **17**, 413.
Komori (1924): *Jl. of Orient. medicin*, **2**, 37.
Kossel und Kutscher (1901): *Zs. f. physiol. Chem.*, **31**, 165.
Mellanby (1907): *Jl. of physiol.*, **36**, 474.
Müller und Masuyama (1900): *Zs. f. Bio.*, **39**, 547.
Nakamura (1928): *Jl. of Biochem.*, **10**, 357.
Needham (1925): *Physiol. Reviews*, **5**, 36.
Roger (1908): *Jl. de Physiol. et de Pathol. gén.*, **10**, 797.
Sagara (1929): *Jl. of Biochem.*, **10**, 379.
Sendju (1927): *Jl. of Biochem.*, **7**, 171.
Takahashi (1934): *Jl. of Biochem.*, **21**, 45.
Takamatsu und Kamachi (1934): *Jl. of Biochem.*, **21**, 53.
Tichomiroff (1885): *Zs. f. physiol. chem.*, **9**, 566.
Tomita (1921): *Biochem. Zs.*, **116**, 12.
Tomita (1928): *Jl. of Biochem.*, **10**, 351.
Tomita und andere (1933-1934): *Jl. of Biochem.*, **17**, 401-422.

ÜBER DIE ENTGIFTUNGSVORGÄNGE IM KANINCHENORGANISMUS BEI B-AVITAMINOSE.

VON

TEKI KUMON.

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen Fakultät
zu Nagasaki. Ausgeführt unter Leitung von Prof. M. Tomita.)*

(Eingegangen am 10. Februar 1935)

Bei Einführung von Giftstoffen in den tierischen Organismus werden diese Stoffe, die ja dem tierischen Organismus zum grössten Teil ganz fremd sind, bald nach ihrem Eintritt in eine bestimmte Form gebracht, in dieser durch den Körper geleitet und im Harn ausgeschieden. Der ganze Vorgang wird als ein Schutz des tierischen Organismus gegen eindringende fremdartige Stoffe aufgefasst. Manchmal aber erledigt er sich ihrer durch Abbau. Ist aus irgend einem Grunde eine Zerstörung der schädlichen Substanz unmöglich, so kommt es, wenn irgend möglich, zur Paarung. In der Tat ist als sicher festgestellt, dass manchmal eine schädliche Verbindung durch Kuppelung mit bestimmten Produkten wie Glykokoll, Schwefelsäure und Glukuronsäure, in eine unschädliche oder doch viel weniger schädliche verwandelt wird. Bei verschiedenen Stoffwechselanomalien gehen diese Entgiftungsvorgänge nicht immer in gleicher Weise vor sich, sondern erfolgen auf verschiedenartigen Wegen.

Es ist heute ganz eindeutig festgestellt, dass die Vitamine unerlässliche Faktoren im normalen Stoffwechsel darstellen. Bei ihrem Fehlen treten charakteristische Ausfallserscheinungen auf, die auf für die einzelnen Vitamine spezifischen Stoffwechselanomalien beruhen sollen.

Während einerseits schon vielfach untersucht worden ist, wie mannigfaltig der Gesamtstoffwechsel durch die verschiedenen Avitaminosen beeinflusst wird, liegen andererseits in Hinsicht auf den intermediären Stoffwechsel bei Avitaminosen nur spärliche Angaben vor. Es ist bekanntlich ein guter Nachweis von Kotake (1931),

dass sich bei subcutaner Einspritzung von Tryptophan an Kaninchen, die tage- bis wochenlang mit poliertem Reis ernährt worden sind, eine reichliche Kynureninausscheidung findet, was vielleicht durch Schwäche der allgemeinen Oxydationsvorgänge bedingt wird. Betreffs der Entgiftung bei B-Avitaminose hat andererseits A. Abe (1926) den erkrankten Hunden Kampfer, Chloralhydrat und Phenol verabreicht und gefunden, dass die entgiftende Wirkung dabei herabgesetzt wurde.

Im Anschluss an die bereits mitgeteilten Beobachtungen habe ich den vorliegenden Versuch unternommen, um die Frage klarzustellen, wie die verschiedenen Entgiftungsvorgänge bei Mangel des B-Vitamins sich verhalten mögen. Meine Untersuchungen wurden ausschliesslich an Kaninchen ausgeführt, die während der ganzen Zeit der Versuche einer gänzlichen Karenz des Faktors B unterworfen waren. Den Versuchstieren wurden zunächst Benzoesäure, Phenylessigsäure und Phenylpropionsäure verabreicht und die Glykokoll-Paarung untersucht. Bei Darreichung von Benzoesäure und Hippursäure wurde die Benzoesäureausscheidung genau verglichen. Durch Verabreichung von Phenol und Indol hat man den Harn auf Ätherschwefelsäurebildung verarbeitet. Bei Verabfolgung des letzteren wurde die Indikanbildung geprüft. Die Paarung der Glukuronsäure wurde durch Kampferverabreichung vergleichend untersucht. Endlich hat man Pyridin dargereicht und die Methylierungsvorgänge bei normalen und B-avitaminösen Tieren vergleichend verfolgt. Es zeigt sich dabei, dass die Glykokollpaarung bei Benzoesäure-, Phenylessigsäure- und Phenylpropionsäuredarreichung bei normalen und B-avitaminösen Tieren ganz gleich bleibt, während die Paarung mit Schwefelsäure sowie die Indicanbildung und Methylierung bei B-Avitaminose etwas herabgesetzt sind gegenüber normalen Tieren. Merkwürdigerweise ist die Menge der ausgeschiedenen Benzoesäure bei Verabreichung derselben oder von Hippursäure bei der B-Avitaminose sehr gering.

EXPERIMENTELLE BELEGE.

A. ÜBER DIE GLYKOKOLL-PAARUNG IM ORGANISMUS DES
B-AVITAMINÖSEN KANINCHENS.

Gesunde Kaninchen wurden ausschliesslich mit poliertem Reis, Pflanzenöl, Kasein und Salzmischung gefüttert. Nach 3 Wochen wurden Benzoesäure, Phenylelessigsäure oder Phenylpropionsäure als Natriumsalz in 10%iger Lösung in täglichen Dosen von 1 g per Kopf subcutan verabreicht.

1. Applikation von Benzoesäure.

Der Harn des Versuchstieres wurde nach Bunge und Schmiedeberg (1877) auf Hippursäure und Benzoesäure verarbeitet. Der mit Sodalösung alkalisch gemachte Harn wurde abfiltriert, das Filtrat mit Essigsäure neutralisiert und zu dickem Sirup eingedampft. Man hat den Rückstand mit kaltem Alkohol ausgezogen, die alkoholischen Auszüge eingedampft, mit Salzsäure versetzt und dann mit Essigäther 5 Mal ausgeschüttelt. Der klare Essigätherauszug wurde mit Wasser ausgewaschen und bei mässiger Temperatur verdunstet, der Rückstand mit Petroläther ausgekocht. Die Benzoesäure löste sich in Petroläther, während die Hippursäure ungelöst im Rückstand blieb. Der Rückstand wurde in heissem Wasser gelöst, filtriert und bis zur Krystallisation eingeeengt.

Andererseits wurde gesunden Kaninchen Benzoesäure in gleicher Weise verabreicht und der Harn nach demselben Verfahren bearbeitet.

Die Resultate werden in Tabelle I mitgeteilt.

2. Applikation von Phenylelessigsäure.

Der Harn wurde eingedampft und mit Alkohol ausgezogen, der alkoholische Auszug verdunstet, mit starker Salzsäure angesäuert und nach einiger Zeit wurde die abfiltrierte Lösung mit Essigäther 5 Mal geschüttelt, der Essigätherauszug mit Sodalösung und diese nach Ansäuern mit Salzsäure wieder mit Essigäther geschüttelt. Der beim Abdestillieren des Essigäthers verbleibende Rückstand wurde mit Wasser zum Sieden erhitzt, nach 24 stündigem Stehen

TABELLE I.

Art der Versuchstiere	Menge der injizierten Benzoesäure g	Hippursäure ausgeschieden		Benzoesäure wiedergefunden	
		g	%	g	%
B-Avitaminose	9,32	8,75	64,01	1,39	14,92
"	"	9,37	68,54	1,61	17,22
"	"	9,98	73,01	1,38	14,81
"	"	8,85	64,74	0,66	7,08
"	4,24	4,08	65,70		
"	2,96	2,82	64,83		
Gesund	9,22	8,80	64,37	3,44	36,91
"	"	5,18	37,89	4,17	44,74
"	"	10,86	79,44	0,74	7,94

abfiltriert. Beim Einengen des Filtrates schied sich die Phenacetursäure ab.

Die Ergebnisse sind in Tabelle II niedergelegt.

TABELLE II.

Art der Versuchstiere	Menge der injizierten Phenyllessigsäure g	Phenacetursäure		
		berechnet	gefunden	
		g	g	%
B-Avitaminose	5,00	7,10	3,70	52,11
"	"	"	4,03	56,76
Gesund	5,00	7,10	3,12	43,94
"	"	"	3,88	54,65
"	"	"	4,61	64,93

3. Applikation von Phenylpropionsäure.

B-avitaminöse Kaninchen erhielten je 1,0 g Phenylpropionsäure als Natriumsalz in 10%iger Lösung subcutan eingespritzt. Der Harn wurde nach dem Verfahren von Bunge und Schmiedeberg (1877) auf Hippursäure verarbeitet. Als Kontrolle hat man

gesunden Kaninchen phenylpropionsaures Natrium in gleicher Weise verabreicht.

Die Befunde sind in der nachstehenden Tabelle verzeichnet.

TABELLE III.

Art der Versuchstiere	Menge der injizierten Phenylpropionsäure g	Hippursäure		
		berechnet	gefunden	
			g	%
B-Avitaminose	4,00	4,77	3,12	65,41
„	„	„	2,91	61,01
„	„	„	3,23	67,71
Gesund	4,00	4,77	3,15	66,04
„	„	„	3,08	64,57

B. ÜBER DAS VERHALTEN DER HIPPURSÄURE IM TIER-ORGANISMUS BEI B-AVITAMINOSE.

Bei den obenerwähnten Versuchen von Benzoesäureapplikation hat man beobachtet, dass die Menge der ausgeschiedenen Benzoesäure im Harn bei der B-Avitaminose überhaupt geringer ist, als bei normalen Tieren. Ob dies auf die mangelhafte Ausscheidung der Benzoesäure zurückzuführen ist oder durch die Spaltungskräfte der Hippursäure verursacht wird, ist nicht aufgeklärt. So habe ich hier einerseits normalen und B-avitaminösen Tieren Hippursäure verabreicht und die Benzoesäureausscheidung im Harn verglichen. Andererseits wurde die hippurikatische Wirkung in der Leber und Niere bei gesunden und erkrankten Tieren vergleichend untersucht.

1. Applikation von Hippursäure.

Reine Hippursäure wurde gesunden und B-avitaminösen Kaninchen als Natriumsalz in täglichen Dosen von 1,0 g per Kopf in 10%iger Lösung subcutan verabreicht. Der Harn wurde wie oben erwähnt auf Hippursäure und Benzoesäure verarbeitet.

Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle mitgeteilt.

TABELLE IV.

Art der Versuchstiere	Menge der injizierten Hippursäure g	Hippursäure wiedergefunden		Benzoessäure ausgeschieden	
		g	%	g	%
B-Avitaminose	10,00	8,62	86,20	0,34	4,99
„	„	7,86	78,60	0,05	0,73
„	„	9,26	92,60	0,05	0,73
„	„	8,10	81,00	0,07	1,03
Gesund	10,00	8,83	88,30	0,43	6,30
„	„	8,24	82,40	1,06	15,54
„	„	7,35	73,50	1,88	27,54
„	„	9,21	92,10	0,70	10,30

Es offenbarte sich somit, dass die Benzoessäureausscheidung bei B-Avitaminose deutlich herabgesetzt ist, während die wiedergefundene Menge der Hippursäure bei normalen und erkrankten Tieren fast gleich ist.

2. Versuche mit Organbrei.

Bei diesen Versuchen kamen Leber und Niere von gesunden und B-avitaminösen Kaninchen in Anwendung. Mit physiologischer Kochsalzlösung gut gemischter Organbrei von frisch getöteten Tieren wurde mit 10 ccm einer 10%igen Lösung von hippursäurem Natrium nebst Toluol vermischt und unter öfterem Umschütteln bei 38° im Brutschrank belassen. Wurde die Keimfreiheit nach 4 Tagen nachgewiesen, so wurde das Digerat enteiwesst und aus dieser Lösung wurden Benzoessäure und Hippursäure wie zuvor ermittelt.

Die Befunde sind in der nachstehenden Tabelle verzeichnet. Es zeigt sich dabei, dass die hippurikatische Wirkung in der Leber und Niere bei gesunden und erkrankten Tieren in gleichem Grade zu beobachten war.

Jeder Versuch war von einem Kontrollversuch begleitet, welcher unter genau denselben Bedingungen wie der Hauptversuch stand, von dem er sich nur durch die Anwendung gekochten

TABELLE V.

Art der Versuchstiere	Menge des verwendeten Organbreies	Hippursäure zugesetzt g	Benzoesäure			Hippursäure wieder gefunden g
			berechnet g	gefunden		
				g	%	
B-Avitaminose	5 g Leber	1,0	0,6815	0,0195	2,86	0,8956
„	„ „	„	„	0,0122	1,79	0,8682
Gesund	5 g Leber	1,0	0,6815	0,0146	2,14	0,9129
„	„ „	„	„	0,0195	2,86	0,9205
B-Avitaminose	5 g Niere	1,0	0,6815	0,0427	6,27	0,8180
„	„ „	„	„	0,0238	3,49	0,9174
Gesund	5 g Niere	1,0	0,6815	0,0366	5,37	0,8789
„	„ „	„	„	0,0311	4,56	0,6981

Organbreies unterschied. Bei diesem Kontrollversuch wurde festgestellt, dass gekochter Organbrei keine hippursäurespaltende Wirkung hat.

C. ÜBER DIE ÄTHERSCHWEFELSÄUREBILDUNG IM KANINCHEN-ORGANISMUS BEI B-AVITAMINOSE.

Es ist bekannt, dass die Menge der gepaarten Schwefelsäure einerseits von der Art der Nahrung, andererseits aber auch von der Intensität und der Art der Darmfäulnis abhängig ist. Zunächst habe ich die Bildung dieser Säure bei gesunden und B-avitaminösen Kaninchen verglichen und dann die Verhältnisse bei Applikation von Phenol und Indol untersucht.

1. Vergleichende Bestimmung der Ätherschwefelsäure im Harn der normalen und B-avitaminösen Kaninchen.

Mit dem Harn des Versuchstieres wurden die Sulfatschwefelsäure und die Gesamtschwefelsäure nach dem Verfahren von Folin (1906) ermittelt. Man ermittelt die Menge der gepaarten Schwefelsäure durch Subtraktion der Sulfatschwefelsäure von der Gesamtschwefelsäure.

Die Resultate sind kurz in folgender Tabelle zusammengestellt.

TABELLE VI.

Tagesmenge der Ätherschwefelsäure (als BaSO ₄ berechnet)	
bei	
B-Avitaminose	Gesund
0,0240 g	0,0470 g
0,0360	0,0295
0,0430	0,0347
0,0115	0,0340
0,0400	0,0400
0,0128	0,0248
0,0144	0,0168
0,0210	0,0275
0,0224	0,0200
0,0280	
0,0219	

Zwischen beiden Fällen kann man keine grosse Differenz beobachten.

2. Applikation von Phenol.

Gesunden und B-avitaminösen Kaninchen wurde je 10 ccm 2,5 %iger Phenollösung subcutan eingespritzt und der Harn auf Ätherschwefelsäure verarbeitet. Wie in Tabelle VII verzeichnet, ist die Bildung der Phenolschwefelsäure bei B-Avitaminose etwas herabgesetzt gegenüber normalen Tieren.

TABELLE VII.

Art der Versuchstiere	Menge des injizierten Phenols g	Ätherschwefelsäure (als BaSO ₄ berechnet)		
		berechnet	gefunden	
		g	g	%
B-Avitaminose	0,25	0,6207	0,1372	17,13
"	"	"	0,1074	12,32
"	"	"	0,1041	11,79
"	"	"	0,0645	5,41
"	"	"	0,1296	15,90
Gesund	0,25	0,6207	0,1231	13,87
"	"	"	0,1849	23,83
"	"	"	0,1363	16,00
"	"	"	0,1256	14,27
"	"	"	0,1944	25,36

3. Applikation von Indol.

Gesunde und an B-Avitaminose erkrankte Kaninchen erhielten je 0,15 g Indol in 5%iger Lösung subcutan injiziert. Die Ätherschwefelsäure im Harn wurde gravimetrisch nach Folin (1906) ermittelt. Die Resultate sind kurz in Tabelle VIII zusammengestellt.

TABELLE VIII.

Art der Versuchstiere	Menge des injizierten Indols g	Ätherschwefelsäure (als BaSO ₄ berechnet)		
		berechnet g	gefunden	
			g	%
B-Avitaminose	0,15	0,2992	0,1690	49,77
"	"	"	0,1100	30,05
"	"	"	0,0740	18,01
"	"	"	0,1281	36,10
"	"	"	0,1639	48,06
"	0,10	0,1995	0,1061	43,11
Gesund	0,15	0,2992	0,2800	86,23
"	"	"	0,2550	77,87
"	0,10	0,1995	0,1099	44,06

D. ÜBER DIE BILDUNG VON HARNINDICAN IM KANINCHEN-ORGANISMUS BEI B-AVITAMINOSE.

Harnindican kommt gewöhnlich nicht im Harn des gesunden Kaninchens vor, wohl aber nach Eingabe von Indol. Im Harn der an B-Avitaminose erkrankten Kaninchen fand ich nur wenig Indoxylschwefelsäure. Nach Eingabe von Indol wird eine Vermehrung des Harnindicans gefunden. Die Ermittlung des Harnindicans wurde nach dem Verfahren von Bouma (1901) ausgeführt, welches auf der Überführung des gesamten Indoxyls in Indigrot durch Kochen des Harns mit Isatinsalzsäure und Titration des Indigrots als Indigrotsulfosäure mit Permanganat beruht.

Die Ergebnisse sind in Tabelle IX niedergelegt.

TABELLE IX.

Art der Versuchstiere	Menge des injizierten Indols g	Harnindican (als Indigrot)			Harnindican (als Indigrot) vor der Injektion g
		berechnet	gefunden		
			g	g	
B-Avitaminose	0,15	0,1680	0,0918	50,51	0,0087
„	„	„	0,0603	31,74	0,0077
„	„	„	0,0856	46,81	0,0090
„	„	„	0,0934	51,44	0,0067
„	0,10	0,1120	0,0577	45,30	0,0048
Gesund	0,15	0,1680	0,1242	73,94	0
„	„	„	0,1703	101,40	0
„	0,10	0,1120	0,0929	82,97	0

E. ÜBER DIE GLUKURONSÄURE-PAARUNG IM KANINCHEN-ORGANISMUS BEI B-AVITAMINOSE.

Gepaarte Glukuronsäuren finden sich im normalen Kaninchenharn in kleinen Mengen. Künstlich zugeführter Kampfer paart sich vorzugsweise mit Glukuronsäure. Gesunde und an B-Avitaminose erkrankte Kaninchen erhielten je 0,4 g Kampfer in 10 %iger Olivenöllösung subcutan eingespritzt. Die gepaarte Glukuronsäure im Harn wurde nach Jolles(1909) als Furfurophloroglucid gravimetrisch bestimmt. Die Resultate sind in Tabelle X verzeichnet.

Aus den Daten der Tabelle ist zu ersehen, dass sich die Glukuronsäurepaarung bei gesunden und an B-Avitaminose erkrankten Kaninchen fast in gleichem Grad vollzieht.

F. ÜBER DIE METHYLIERUNG DES PYRIDINS IM KANINCHEN-ORGANISMUS BEI B-AVITAMINOSE.

Tomita (1921) hat festgestellt, dass das Kaninchen befähigt ist, wenn auch in geringerer Menge, eingegebenes Pyridin in die Methylverbindung überzuführen. Gesunde und B-avitaminöse Kaninchen erhielten je 2,0 g Pyridin täglich als essigsaures Salz in

TABELLE X.

Art der Versuchstiere	Menge des injizierten Kampfers g	Gepaarte Glukuronsäure (als Furfurolphloroglucid)			Gepaarte Glukuron- säure vor- der Kampfer- injektion. (als Furfurol- phloroglucid) g
		berechnet	gefunden		
			g	g	
B-Avitaminose	0,40	0,5368	0,0912	12,41	0,0217
„	„	„	0,1604	25,30	0,0325
„	„	„	0,1325	20,10	0,0263
„	„	„	0,1580	24,85	0,0295
„	„	„	0,1134	16,54	0,0213
„	„	„	0,1276	19,19	0,0162
Gesund	0,40	0,5368	0,1249	18,29	0,0283
„	„	„	0,1425	21,57	0,0312
„	„	„	0,1550	23,90	0,0269
„	„	„	0,1658	25,91	0,0277
„	„	„	0,1597	24,78	0,0262
„	„	„	0,1454	22,11	0,0203

10%iger Lösung subcutan injiziert. Der Urin des Versuchstieres wurde genau nach Tomita auf Methylpyridylammoniumhydroxyd verarbeitet. Die Ergebnisse gehen aus folgender Übersicht hervor.

TABELLE XI.

Art der Versuchstiere	Menge des injizierten Pyridins g	Methylpyridylammoniumhydroxyd (Pt-Salz)		
		berechnet	gefunden	
			g	%
B-Avitaminose	6,50	49,04	0,0416	0,0848
"	"	"	0,0340	0,0693
"	"	"	0,0675	0,1376
"	"	"	0,0560	0,1142
Gesund	6,50	49,04	0,0545	0,1111
"	"	"	0,0659	0,1344
"	"	"	0,0882	0,1799
"	"	"	0,0593	0,1209

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Sowohl bei gesunden, als auch bei an B-Avitaminose erkrankten Kaninchen zeigte sich kein auffallender Unterschied in der Glykokollpaarung der verabreichten Benzoesäure, Phenylelessigsäure und Phenylpropionsäure.

2. Die Benzoesäureausscheidung im Harn bei der Applikation von Benzoesäure oder Hippursäure ist bei B-Avitaminose deutlich herabgesetzt.

3. Die hippursäurespaltende Wirkung in der Leber und Niere war bei gesunden und B-avitaminösen Tieren in gleichem Grade zu beobachten.

4. Die Paarung der Ätherschwefelsäure nach Eingabe von Phenol und Indol ist bei der B-Avitaminose immer schwächer als bei gesunden Tieren.

5. Harnindican kommt gewöhnlich nicht im Harn des gesunden Kaninchens vor, während im Harn der an B-Avitaminose erkrankten Tiere nur wenig Indoxylschwefelsäure nachweisbar ist.

6. Die Bildung des Harnindicans nach Eingabe von Indol ist bei der B-Avitaminose etwas geringer als bei gesunden Tieren.

7. Inbezug auf Glukuronsäurepaarung ist keine deutliche Differenz bei gesunden und an B-Avitaminose erkrankten Tieren zu beobachten.

8. Bei B-Avitaminose scheint die Methylierung des verabfolgten Pyridins gegenüber den normalen Tieren etwas herabgesetzt zu sein.

LITERATUR.

- Abe, A. (1926): *Jl. of Oriental medicine*, 5.
Bouma, J. (1901): *Hoppe-Seylers Zs.*, 32, 82.
Bunge u. Schmiedeberg (1877): *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 6, 233.
Folin (1906): *Jl. of biol. Chem.*, 1, 131.
Jolles, C. (1909): *Hoppe-Seylers Zs.*, 61, 101.
Kotake, Y. (1931): *Hoppe-Seylers Zs.*, 195, 139.
Tomita, M. (1921): *Biochem. Zs.*, 116, 48.

FERMENTWIRKUNG IM VOGELORGANISMUS BEI B-AVITAMINOSE.

Von

S. TSUNOO, M. TAKAMATSU, T. KAMACHI u. M. IMAIZUMI.

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen Fakultät
Nagasaki. Ausgeführt unter Leitung von Prof. Dr. M. Tomita.)*

(Eingegangen am 10. Februar 1935)

Überall, wo sich Lebensvorgänge abspielen, begegnen wir den Fermenten. Wir sind berechtigt, an die Möglichkeit zu denken, dass alle tiefgehenden chemischen Umsetzungen, welche sich in lebenden Organismen abspielen, an bestimmte Fermentwirkungen geknüpft sind. Fermente sind es, die die Wechselbeziehungen zwischen den verschiedenen Organismen ermöglichen. Sie zerlegen art- und körperfremdes Material in neutrale Verbindungen und schaffen so das Bau- und Betriebsmaterial für den einzelnen Organismus und die einzelnen Zellen. Die Fermente beherrschen und vermitteln also den gesamten Zellstoffwechsel.

Allen Bemühungen zum Trotz kennen wir von den Fermenten einstweilen nur ihre Wirkung und die Bedingungen, die notwendig sind, um diese in jedem Einzelfalle zu entfalten. Grosse Fortschritte sind auf dem Gebiete der Reindarstellung bestimmter Fermente erst in der letzten Zeit erzielt worden. Darüber hinaus sind ganz neue Einblicke in die für die Fermentwirkung notwendigen Bedingungen möglich geworden.

Es sind mannigfache Bestandteile des pflanzlichen und tierischen Organismus bekannt, die zur Gruppe der Aktivatoren sogenannter Vorstufen von Fermenten oder der Kofermente gehören und anregend auf verschiedene Fermentfunktionen einwirken.

Seit dem K. Kurono (1915) gezeigt hatte, dass die Vitamine den Prozess der alkoholischen Zuckerspaltung fördern, ist die Rolle der vitaminhaltigen Stoffe aus den Tier- und Pflanzenreich in sehr zahlreichen Arbeiten nach der gleichen Richtung hin untersucht

worden, wobei vielfach positive Resultate erzielt werden konnten.

Man hat nun natürlich die Frage aufgeworfen, wie man sich die Wirkung der Vitamine auf die Alkoholgärung zu erklären hat. Wie Tomita (1922) hervorgehoben hat, sieht man eine Ähnlichkeit in der Wirkung der Vitamine mit einer anderen Klasse von Substanzen, den sogenannten Hormonen. Analog derjenigen der Hormone kann man sich die Wirkung der Vitamine auf die Fermenttätigkeit vorstellen. Dabei lässt sich eine Spezifikation angesichts der Reizwirkung der Hormone und Vitamine denken.

Um die Frage, wie weit die Wirkung der verschiedenen Organfermente durch Vitamine beeinflusst wird, auf dem experimentellen Wege zu entscheiden, sind Fermentuntersuchungen bei Avitaminosen sehr geeignet. Wir haben zunächst die Leber, die Niere, die Milz, die Bauchspeicheldrüse, den Darm und den Hoden der B-avitaminösen Vögel auf Nuklease, Phosphatase, Glykogenase, Amylase, Urease, Lipase, Arginase und Protease untersucht.

EXPERIMENTELLES.

Wir wählten als Versuchstiere Tauben und Hühner und verabreichten ihnen B-factorfreies Futter. Nach etwa 3 Wochen zeigten die Tiere die charakteristischen Symptome. Die Tiere bewegen sich schwerfällig und schwankend fort. Es folgen Trägheit und Unbeholfenheit, Unsicherheit, Ungeschicklichkeit. Unentschlossenheit und schlechtes Beherrschen des Gleichgewichtes.

Die Organe der B-avitaminösen Tiere wurden nach dem Zerschneiden mit der 10 fachen Menge Wasser versetzt und der homogene Brei wurde in 2 gleiche Portionen geteilt, wovon die eine der Substratlösung beigemischt und unter Zusatz von Toluol bei 37–38° digeriert wurde. Die andere Portion wurde jedesmal unter Innehaltung identischer Bedingungen für die Kontrollversuche der bei der Autolyse von Organmaterial allein auftretenden Umsetzung verwendet. Selbstverständlich wurde durch einen weiteren Kontrollversuch untersucht, wie sich eine gleiche grosse digerierte wässrige Lösung von Substraten dabei verhält.

Bei der Untersuchung von Amylase wurde 1% Dextrinlösung als Substrat verwendet. Der abgespaltene Zucker wurde nach

Bertrand ermittelt. Esterasewirkung in dem Versuchsmaterial haben wir nach dem Rona-Michaelisschen Verfahren mit Tributyrin untersucht. Beim Versuche von Trypsinwirkung wurden 0.5 g Gänsemuskel als Substrat benutzt. Bei der Ureaseuntersuchung benutzten wir 10% Ureaselösung als Substrat und Phosphatgemisch als Pufferlösung. Glycerophosphatasewirkung haben wir mit glycerinphosphorsaurem Natrium untersucht. Beim Versuche betreffend Nukleasewirkung wurde nukleinsaures Natrium als Substrat benutzt. Die abgespaltene Phosphorsäure wurde nach Neumann ermittelt. Bei der Untersuchung der Arginasewirkung diente als Substrat das kohlen saure Arginin.

Die Ergebnisse sind, auf 100 g frisches Material berechnet, in den folgenden Tabellen (Tab. I-VIII) schematisch verzeichnet.

TABELLE I.
Nuklease.

Versuchstiere	Verwendet. Organ	Digestionsdauer in Tagen	Abgespaltene Phosphorsäure (als P_2O_5)mg	
			bei B-avitaminösen Tieren	bei gesunden Tieren
Taube	Niere	3	4273	9693
"	"	"	4796	
Huhn	Leber	3	1575	1342
"	"	"	1086	1805
"	Niere	"	1725	966
"	"	"	1728	1245
"	"	"	3012	1362
"	Milz	"	1153	3821
"	"	"	709	2549
"	Hoden	"	397	1058
"	"	"	3379	998

TABELLE II.
Glycero-Phosphatase.

Versuchstiere	Verwendet. Organ	Digestionsdauer in Tagen	Abgespaltene Phosphorsäure (als P_2O_5)mg	
			bei B-avitaminösen Tieren	bei gesunden Tieren
Taube	Leber	3	2774	1470
"	"	"	3599	1684
"	"	"		1082
"	Niere	"	8722	7052
"	"	"	9166	20284
"	"	"	8101	28727
"	Darm	"	10861	5992
"	"	"	7354	3267
Huhn	Leber	3	3191	2783
"	"	"	3432	2695
"	"	"		1703
"	Niere	"	3914	2726
"	"	"	4456	6384
"	"	"	4678	6930
"	Milz	"	4454	3895
"	"	"	4606	2776
"	"	"	3499	4693

TABELLE III.
Glykogenase.

Versuchstiere	Verwendet. Organ	Digestionsdauer in Tagen	Abgespaltener Traubenzucker mg	
			bei B-avitaminösen Tieren	bei gesunden Tieren
Taube	Leber	1	5833	5358
"	"	"	8095	4676
"	"	"	3502	1659
"	Pankreas	"	87100	141571
"	"	"	88250	42000
"	Darm	"	8796	3424
"	"	"	687	2817
Huhn	Leber	1	7100	2137
"	"	"	6061	652
"	"	"	5802	
"	Hoden	"	4930	2789
"	"	"		3017
"	"	"		2076

TABELLE IV.
Amylase.

Versuchs- tiere	Verwendet. Organ	Digestions- dauer in Tagen	Abgespaltener Traubenzucker mg	
			bei B-avitaminö- sen Tieren	bei gesunden Tieren
Taube	Leber	1	14766	4868
"	"	"	12358	4510
"	"	"		10017
"	Pankreas	"	104777	30033
"	"	"	65629	122625
"	"	"	53966	100666
"	Darm	"	13085	19861
"	"	"	11109	12559
"	"	"	12036	11818
Huhn	Leber	1	6365	2758
"	"	"	7270	1644
"	"	"	6092	
"	Pankreas	"	23402	28882
"	"	"	50937	46080
"	"	"		45160
"	"	"		44999
"	Hoden	"	9116	6971
"	"	"		4836
"	"	"		3012

TABELLE V.
Urease.

Versuchs- tiere	Verwendet. Organ	Digestions- dauer in Tagen	n/10-H ₂ SO ₄ -Menge(ccm) bei Titration des abgespaltenen Ammoniaks	
			B-avitaminö- sen Tieren	gesunden Tieren
Taube	Leber	3	110	1809
"	"	"	85	
"	Niere	"	1192	1740
"	"	"	887	
Huhn	Leber	3	3637	59
"	"	"	177	19
"	"	"	84	
"	Niere	"	97	133
"	"	"	135	120

TABELLE VI.
Esterase.

Versuchstiere	Verwendet. Organ	Digestionsdauer in Tagen	Gebrauchte $n/10$ -NaOH-Menge ccm	
			B-avitaminösen Tieren	gesunden Tieren
Taube	Pankreas	3	17792	8773
"	"	"	10317	4750
"	"	"		2610
Huhn	Pankreas	3	4278	665
"	"	"	4183	71
"	"	"	3069	

TABELLE VII.
Arginase.

Versuchstiere	Verwendet. Organ	Digestionsdauer in Tagen	Abgespaltene Harnstoffmenge als Dixanthylharnstoff g	
			B-avitaminösen Tieren	gesunden Tieren
Taube	Leber	3	0,894	0,787
"	"	"	1,355	0,014
"	"	"		0,364
"	"	"		0,787
"	"	"	33,272	
"	"	"	73,462	37,914
Huhn	Leber	3	2,470	0,950
"	"	"	7,460	
"	"	"	3,389	

TABELLE VIII.
Protease.

Versuchstiere	Verwendet. Organ	Digestionsdauer in Tagen	Rest-N-Menge (als $n/10$ -H ₂ SO ₄) ccm	
			B-avitaminösen Tieren	gesunden Tieren
Taube	Pankreas	7	17752	20700
"	"	"	8458	25108
"	"	"		11539
"	"	"		44994
Huhn	Pankreas	7	10306	1973
"	"	"		12000
"	"	"		15220

ZUSAMMENFASSUNG.

Es bestehen hinsichtlich der Fermentwirkung der tierischen Organe grosse individuelle Schwankungen und keine sehr wesentlichen Unterschiede zwischen den Geweben von gesunden und B-avitaminösen Tieren.

Man hätte vielleicht eine allgemeine verminderte Fermentbetätigung bei B-Avitaminose erwarten sollen. Bei unserer Versuchsanordnung ist ja die Hydrolyse der Glycerinphosphorsäure durch Nierenphosphatase der B-avitaminösen Vögel schwächer als bei den gesunden Tieren. Inbezug auf Pankreasesterase und Leberamylase trat jedoch das Gegenteil zutage, indem das Vogelpankreas bei B-Avitaminose kräftiger verseifend wirkt und die Leber derselben Tiere zugesetzte Polysaccharide stärker angriff als bei gesunden Tieren.

LITERATUR.

- Kurono, K. (1915): *Jl. of the Coll. of Agricul. Imp. Univ. Tokio*, **5**, 305.
Kurono, K. und Gunke, M. (1915): *Jl. of the Scient. agricul. Soc.*, **1915**, 79.
Tomita, M. (1922): *Biochem. Zs.*, **131**, 175.

ÜBER DIE EXTRAKTIVSTOFFE DES MUSKELS BEI RIESENSALAMANDERN (MEGALOBATRACUS JAPONICUS) IM WINTERSCHLAF.

VON

TAKESI IWASAKI.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut zu Okayama.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 12. Februar 1935)

Die Untersuchung über die Extraktivstoffe der Organe und Gewebe von verschiedenen Tieren ist nicht nur vom Standpunkt der vergleichenden Biochemie aus von Bedeutung, sondern auch für die Erkennung des intermediären Stoffwechsels des spezifischen Tierorganismus. Entwicklungsgeschichtlich bestehen zwischen den Wirbeltieren und den wirbellosen Tieren sowie zwischen den warmblütigen und kaltblütigen Tieren Unterschiede in den Bestandteilen der Extraktivstoffe. Seit langem haben daher viele Forscher die Extraktivstoffe der Organe und Gewebe von zahlreichen höheren und niederen Tieren untersucht, und zwar ist besonders der neue systematische Versuch über den Extraktivstoff der Wirbellosen von Kutscher, Ackermann, Gulewitsch und ihren Schülern hervorzuheben. Von ihnen wurde der Extraktivstoff sowohl der niederen Tiere als auch der höheren Säugetiere eingehend untersucht, aber der der Zwischenklassen nur sehr wenig.

Dabei haben sie jedoch der Lebensweise des entsprechenden Tieres keine Aufmerksamkeit geschenkt, durch welche doch der intermediäre Stoffwechsel stark beeinflusst werden muss, nämlich der Aussentemperatur oder der Stärke des Sonnenlichtes bzw. der Ernährung. Bekanntlich ist die Leber oder der Muskel ein Reservewebe der Stoffe, die einerseits als Energiequelle, andererseits als Stoffwechselregulator, wie das Ferment oder das Hormon, dienen sollten. Es ist also selbstverständlich, dass sich der Bestandteil solchen Gewebes unter besonderen Bedingungen wie verschiedene Lebensweise des Tieres je nach der Jahreszeit, in

einem gewissen Masse verändert. In diesem Sinne wurden die stickstoffhaltigen Extraktivstoffe der Krötenleber in der Sommerzeit von Shibuya (1931) und die in der Winterzeit von Makino (1933) untersucht. Nach diesen beiden interessanten Arbeiten ist ein grosser Stoffwechselunterschied zwischen der Wach- und Winterschlafzeit festgestellt, es tritt nämlich im Sommer in der Leber ein für das Leben notwendiger Stoff wie Tyrosin, das als eine Muttersubstanz des Thyroxins oder Melanins betrachtet wird, ausserordentlich viel stärker auf als im Winter. Die Aminosäuren wie Leucin, Alanin bzw. Valin, die sich alle an der Glykogenie der Leber beteiligen können, verhalten sich dagegen gerade umgekehrt.

Wenn man für die Untersuchung des Extraktivstoffes den Muskel von solchen Tieren, die durch besondere Bedingungen ihre Lebensweise plötzlich verändern, zur Verfügung gestellt hätte, so hätte man die verschiedenen Einflüsse auf den Tierorganismus noch überzeugender verständlich machen können. In diesem Sinne habe ich als Versuchsmaterial die Muskulatur von *Megalobatrachus Japonicus* (Riesensalamander) im Winterschlaf gewählt.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

Die Tiere wurden im Frühling, im März gefangen und unter Enthäutung sofort ausgeweidet. Die abgetragenen Muskeln, insgesamt 4,5 Kg, wurden sofort in Alkohol gebracht. Nach Auspressung des Alkohols aus den Muskeln wurden diese mittelst der Hackmaschine zerkleinert und samt dem alkoholischen Auszug mit der dreifachen Menge Wasser versetzt, unter Erwärmung bei 45–55°C gut durchgerührt und koliert. Der stark abgepresste Rückstand wurde nochmals in gleicher Weise gründlich mit Wasser ausgezogen. Die vereinigten Auszüge wurden zwecks Enteiweissung mit Tannin, Baryt, Schwefelsäure, Bleioxyd und Schwefelwasserstoff hintereinander behandelt. Dieser von Eiweiss befreite Auszug wurde im Vakuum unter 40°C bis auf ein Liter eingengt. Es schieden sich dabei farblose glänzende Krystalle so reichlich ab, dass die Flüssigkeit sich durch weitere Einengung in einen dicken Krystallbrei verwandelte. Die Krystalle wurden abgesaugt, mit absolutem Alkohol, dann mit Äther gewaschen. Die rohe Ausbeute

betrug 27 g. Durch nochmalige Umkrystallisation aus warmem Wasser wurde ein farbloses glänzendes monoklines Prisma erhalten, welches ausschliesslich aus Kreatin bestand. Beim Kochen mit verdünnter Schwefelsäure geht es leicht in Kreatinin über, welches nach der Weylschen und Jaffeschen Probe und durch das Zinkchloriddoppelsalz erwiesen wurde.

0,1190 g Subst. verloren 0,0146 g H_2O .

$\text{C}_4\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ Ber. 12,16% H_2O ; Gef. 12,26% H_2O .

0,1655 g Subst. nach Kjeldahl verbrauchten 37,6 ccm $n/10 \text{ H}_2\text{SO}_4$.

$\text{C}_4\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$ Ber. 32,00% N; Gef. 31,84% N.

Die Mutterlauge von Kreatin wurde weiter im Vakuum zu einer dicken Flüssigkeit eingengt, dabei aber schieden sie ausser Kreatin keine Krystalle, wie Tyrosin, Leucin, mehr ab. Die von Kreatin befreite verdickte Flüssigkeit wurde wieder mit Wasser auf ca. 1 Liter verdünnt und mit Äther 72 Stunden lang mittels des Suto-Kumagawaschen Extraktionsapparates extrahiert, um die Fette und Phosphatide zu entfernen. Bei stark schwefelsaurer Reaktion wurde sie wieder in gleicher Weise mit Äther extrahiert. Aus dem letzten Ätherauszug wurde *d*-Milchsäure als Zinkdoppelsalz isoliert. Die Ausbeute betrug 57 g, die wässrige Lösung drehte das polarisierte Licht nach links.

0,4234 g Subst. verloren 0,0572 g H_2O .

$(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2 \text{Zn} + 2\text{H}_2\text{O}$: Ber. 12,89% H_2O ; Gef. 13,48% H_2O .

0,2612 g Subst. gaben 0,0887 g ZnO .

$(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2 \text{Zn}$: Ber. 26,9% Zn; Gef. 27,2% Zn.

Die von Milchsäure befreite saure Flüssigkeit wurde unter weiterem Zusatz von Schwefelsäure (5%) mit Phosphorwolframsäure gefällt. Diese Fällung wurde in üblicher Weise unter Befreiung von Phosphorwolframsäure in eine Purinbasen-, Histidin-, Arginin-, und Lysinfraktion aufgeteilt.

Die von der Basenfällung abfiltrierte Flüssigkeit wurde unter Entfernung von Phosphorwolframsäure wieder zu einem Sirup eingengt. Nach mehrtägigem Stehen im Eisschrank schied sich ein beträchtlicher Krystall ab, der scharf abgesaugt und aus warmem Wasser umkrystallisiert wurde. Ausbeute ca. 1 g. Dieser

Krystall erwies sich als Kreatin.

Aus der Aminosäurenfraktion wurde also weder Tyrosin noch Leucin isoliert, dessen Vorkommen beim Muskel von Säugetieren gewöhnlich erwartet wird.

Purinbasenfraktion.

Aus dieser Fraktion stellte ich nach Shimizu (1921) Adenin, Xanthin und Hypoxanthin frei und als Pikrat fest. Das in fein gruppierten Nadelchen krystallisierte Adeninpikrat schmilzt bei 279–281°C. Ausbeute 0,136 g.

1,957 mg Subst.: 0,568 ccm N (29,5°, 758,7 mm).

$C_5H_5N_5 \cdot C_6H_3O_7N_3$: Ber. 30,78% N; Gef. 30,74% N.

Das von Ammoniak gereinigte Xanthin zeigte prachtvolle Xanthinreaktion und Weydelsche Reaktion; seine Ausbeute betrug 0,850 g. Es wurde weiter als salpetersaures Xanthinsilber identifiziert, indem das in verdünnter Salpetersäure gelöste Xanthin mit Silbernitratlösung gefällt und aus verdünnter Salpetersäure umkrystallisiert wurde.

2,178 mg Subst.: 0,457 ccm N (26,0°, 760,5 mm).

6,2 mg Subst. lieferten 2,3 mg Ag_2O .

$C_5H_4N_4O_2 \cdot AgNO_3$: Ber. 21,75% N, 33,50% Ag.

Gef. 22,71% N, 34,53% Ag.

Das Hypoxanthin wurde als Pikrat identifiziert, welches aus heissem Wasser umkrystallisiert und als ein charakteristischer wetzsteinförmiger Krystall erhalten wurde, der bei 270°C schmilzt. Ausbeute 0,040 g.

1,928 mg Subst.: 0,489 ccm N (30,5°, 76,0 mm).

$C_6H_4ON_4 \cdot C_6H_3O_7N_3$: Ber. 26,86% N; Gef. 26,80% N.

Trotz der vorsichtigen Untersuchungen konnte ich Guanin in dieser Fraktion nicht finden.

Histidinfraktion.

Die von Purinbasen befreite Basenlösung wurde im Vakuum zu einem Sirup eingeeengt. Die dabei ausgeschiedene geringe Krystallmenge wurde scharf abgetrennt und aus heissem Wasser

umkrystallisiert. Ausbeute 0,1 g.

Der Krystall gab Weylsche und Jaffesche Reaktion für Kreatinin und lieferte mit Salzsäure ein in Prismen krystallisierendes Chlorid, welches bei 275–281°C schmilzt.

2,158 mg Subst.: 0,572 ccm N (27,0°, 759,0 mm).

$C_4H_7ON_2 \cdot HCl$: Ber. 28,10% N; Gef. 28,49% N.

Die von Kreatinin befreite Mutterlauge, die mit Diazobenzolsulfosäure eine intensive Rotfärbung ergab, wurde mit Hilfe von Quecksilbersulfat bei schwefelsaurer Reaktion nach Kossel u. Patten (1903) fraktioniert. Diese Fällung wurde nach Beseitigung von Quecksilber und Schwefelsäure mit alkoholischer Pikrolonsäure gefällt, um das Histidin als Dipikrolonat zu isolieren. Es besteht aus hellgelben büschelförmig gruppierten Nadelchen und schmilzt unter Zersetzung bei 225°C. Die Ausbeute betrug 0,20 g.

2,575 mg, 2,671 mg Subst.: 0,521 ccm, 0,545 ccm N
(20,5°, 756,6 mm).

$C_6H_9N_3O_2 \cdot (C_{10}H_8O_5N_4)_2$: Ber. 22,55% N;
Gef. 22,41% N, 22,70% N.

Das von der Quecksilberfällung abgetrennte Filtrat wurde in die kohlensaure Basenlösung verwandelt, im Vakuum bis zum Trocknen eingedampft und mehrfach mit siedendem Alkohol ausgezogen. Der im Alkohol unlösliche Rückstand wurde in Wasser gelöst, mit basischem Kupferacetat gekocht und filtriert. Das Filtrat wurde wieder eingeeengt, wobei weder Blaufärbung noch Krystallisation auftrat, was auf kein Carnosinkupfer hinweist.

Argininfraktion.

Beim Abdampfen der kohlensauren Basenlösung im Vakuum kamen wenige Krystalle zur Abscheidung, die sich aus heissem Wasser in farblosen feinen Prismen krystallisierten. (0,12 g) Sie erwiesen sich mittelst der Weylschen und Jaffeschen Reaktion und der Bildung des Chlorzinkdoppelsalzes als Kreatinin. Die von Kreatinin abgetrennte Mutterlauge, die Sakaguchische Farbenreaktion ergab, wurde vorsichtig behandelt, um das Arginin abzufangen. Ein kleiner Bruchteil dieser Basenlösung wurde

probeweise mit Kupfercarbonat bei salpetersaurer Reaktion gekocht, filtriert und eingengt, wobei weder die Blaufärbung noch eine Krystallisation beobachtet wurde. Der andere kleine Bruchteil wurde mit gesättigter Pikrinsäurelösung versetzt und die dabei ausgeschiedene Fällung aus heissem Wasser umkrystallisiert. Es krystallisiert sich aus Wasser entweder in eigelben schmalen Tafeln (0.02 g) oder in orangefarbenen kurzen Tafeln (0.03 g). Diese dimorphe Krystallisation und der Schmelzpunkt des Pikrates 201°C lassen das Vorhandensein von Methylguanidin vermuten.

2,2445 mg Subst.: 0,568 ccm N (22,0°, 765,4 mm).

$C_2H_7N_3 \cdot C_6H_3N_3O_7$: Ber. 27,90% N; Gef. 27,82% N.

Um dieses Methylguanidin vollständig zu isolieren, wurde die übrige Basenlösung nach Kutscher u. Lohmann (1906) mit alkoholischer Pikrolonsäurelösung versetzt. Der abfiltrierte Niederschlag wurde aus heissem Wasser mehrmals umkrystallisiert. Das in kleinen Drusen von orangeroten Säulehen krystallisierte Pikrolonat schmilzt unter olivgrüner Verfärbung bei 235°C, bei 291°C. Die Ausbente betrug 0,7 g. Den physikalischen Eigenschaften und der Elementaranalyse nach stimmt es mit dem Methylguanidin-pikrolonat überein.

4,5782 mg Subst.: 7,090 mg CO₂, 1,821 mg H₂O.

2,472 mg Subst.: 0,634 ccm N (19°, 767,7 mm).

$C_2H_7N_3 \cdot C_{10}H_8O_5N_4$: Ber. 42,71% C 4,48% H 29,06% N.

Gef. 42,24% C 4,45% H 29,05% N.

Das von Methylguanidin befreite Filtrat wurde von Pikrolonsäure befreit, mit Hilfe von Phosphorwolframsäure in die kohlen-saure Basenlösung verwandelt und im Vakuum auf ein kleines Volumen eingengt. Dieser wurde unter schwacher Ansäuerung mit Salzsäure eine 10%ige wässrige Goldchloridlösung zugefügt. Der dabei entstandene Niederschlag erwies sich als reduziertes metallisches Gold. Aus dem Filtrat der Goldchloridfällung wurde die Basenlösung wieder durch Phosphorwolframsäure regeneriert, eingengt und mit wässriger Flaviansäurelösung versetzt. Am nächsten Tage wurde die Fällung abgesaugt und aus Wasser mehrmals umkrystallisiert. Der in Drusen von feinen eigelben

Nädelehen gruppierte Krystall schmilzt bei 201°C. Ausbeute 0,60 g. Das hier gewonnene Flavianat stimmt nicht mit Argininflavianat, welches nach Kossel u. Gross (1924) in orangeroten Prismen krystallisiert und bei 258°C schmilzt, überein. Dieses neue Flavianat soll noch weiter genau verfolgt werden. Trotz energischer Verfolgung wurde das in der Argininfraktion gesuchte Arginin nicht gefunden. Die positive Sakaguchische Reaktion in dieser Fraktion muss also wohl auf dem Methylguanidin beruhen (Poller 1926).

Lysinfraktion.

Das von der Silberfällung der Argininfraktion befreite Filtrat wurde in üblicher Weise behandelt, in kohlensaure Basenlösung verandelt und im Vakuum zu Sirup eingedampft. Der Sirup wurde unter Ansäuerung mit Salzsäure im Vakuum bis zum Trocknen verdampft und mit absolutem Alkohol mehrmals erschöpft, wodurch die zurückgebliebenen anorganischen Salze vollständig beseitigt wurden. Der vereinigte alkoholische Auszug wurde unter Abdunsten des Alkohols wieder mit Salzsäure angesäuert und mit gesättigter alkoholischer Sublimatlösung gefällt. Der mit Alkohol gut gewaschene Sublimatniederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt, bis zum Trocknen abgedampft und mit Alkohol extrahiert. Diese alkoholische Lösung wurde mit alkoholischer Platinchloridlösung versetzt; die Fällung wurde mit Alkohol gewaschen und aus salzsäuresaurem heissem Wasser umkrystallisiert. Dabei schied sich ein feiner orangefarbener octaedrischer Krystall in geringer Menge ab. Er schmilzt bei 234°C. Der Krystallform und dem Schmelzpunkt nach handelt es sich höchstwahrscheinlich um das Cholinchloroplatinat, dessen Menge zur Analyse leider nicht ausreichte. Aus dem Filtrat der Sublimatfällung wurde in üblicher Weise die Basenlösung wiederhergestellt und unter Ansäuerung mit Salzsäure mit einer alkoholischen Natriumpinkratlösung gefällt. Die Fällung wurde aus heissem Wasser umkrystallisiert, wobei eine goldgelbe feine Nadel erhalten wurde, die bei 256°C schmilzt. Ausbeute 0,32 g.

3,916 mg Subst.: 0,635 ccm N (21,5°, 759,0 mm).

$C_6H_{14}O_2N_2 \cdot C_6H_3N_3O_7$: Ber. 18,67% N; Gef. 18,66% N.
Dies stimmt mit Lysinpikrat überein.

In dem Extrakt von 4,50 Kg Muskeln von Riesensalamandern, im März gefangen, wurden also *d*-Milchsäure, Kreatin und einige basische Bestandteile festgestellt. Ihr Gehalt wird der Übersicht halber tabellarisch angegeben. Ferner wurde ein Flavianat isoliert, an dessen Identifizierung noch gearbeitet wird.

Basen usw.	Salze		Freie Base(g)	%
Kreatin			27,00	6,00
Kreatinin			0,22	0,05
Purinbasen			0,9154	0,203
Adenin	Pikrat	0,136	0,0504	0,012
Xantin			0,850	0,188
Hypoxanthin	Pikrat	0,040	0,015	0,003
Histidin	Dipikrolonat	0,160	0,0363	0,008
Methylguanidin	Pikrolonat	0,680	0,147	0,033
Lysin	Pikrat	0,320	0,125	0,028
Cholin	Platinat	Spur		Spur
<i>d</i> -Milchsäure	Zinksalz	56,00	41,00	9,10

DISKUSSION ÜBER DAS ERGEBNIS.

Aus der Tabelle kann man das gesamte Ergebnis des im Winterschlaf stattgefundenen intermediären Stoffwechsels im Muskel überblicken. Im Winterschlaf nimmt der Riesensalamander gar keine Nahrung auf und der Reservestoff in der Leber sowie im Muskel wird dann unbedingt verbraucht, obwohl er seinen minimalen Stoffwechsel enthalten muss. Infolgedessen müssen in Organen und Geweben das Stoffwechselprodukt sowie der den Stoffwechsel regulierende Stoff gefunden werden, welche für das Leben des Salamanders im Winter notwendig sind.

Unter den Ergebnissen des vorliegenden Versuches ist beachtenswert, dass Kreatin und Methylguanidin im Muskel reichlich vorkommen. Seit langem ist bekannt, dass das Methylguanidin bei höheren Wirbeltieren als intermediäres Stoffwechselprodukt entsteht und unter pathologischen Verhältnissen im Harn zur

Abscheidung gelangt. So haben Kutscher u. Lohmann (1906) und Engeland (1908) das Methylguanidin mit Novain isoliert. Nach Koch (1913) und Paton u. Scharpe (1927) soll bei Tetanie des parathyreopriven Hundes eine Reihe von Basen im Harn ausgeschieden werden und nach Henderson (1918) dabei der Gehalt an Gesamtguanidin im Muskel merklich herabgesetzt werden. Auf dies letztere ist auch von Watanabe (1917/18) hingewiesen worden. Die parathyreoprive Tetanie steht also in innigem Zusammenhang mit der Methylguanidinvergiftung. Normalerweise soll das im Muskel der höheren Tiere vorkommende Methylguanidin durch die Funktion der Nebenschilddrüse entgiftet werden, obwohl bei Ausfall der Nebenschilddrüsenfunktion kein sicherer Beweis für die Vermehrung des Methylguanidins im Muskel vorhanden ist.

Nach den Untersuchungen von McCallum u. Voegtlin (1909), Collip (1925)) und Tuzioka (1935) ist sicher, dass der Kalkgehalt des Blutes und die Kalkausscheidung im Harn und in der Galle von der Funktion der Nebenschilddrüse abhängig sind. Es muss nämlich das Vorkommen des Methylguanidins zu der Funktion der Nebenschilddrüse und dementsprechend zu dem Kalkstoffwechsel in enger Beziehung stehen. Durch Vermehrung des Kreatins oder des Methylguanidins im Muskel dürfte also unter dem Einfluss der Nebenschilddrüsenfunktion der Kalk im Organismus gespart werden, was noch weiter verfolgt werden muss. Also dürfte das Methylguanidin als Kalkstoffwechselregulator reichlich im Muskel von Salamandern im Winterschlaf vorkommen.

Beachtenswert ist auch noch das Fehlen des Arginins im Salamandermuskel während des Winterschlafes, trotzdem das Kreatin reichlich gefunden wird, was mit der Behauptung von Jaffe (1906) Benech u. Kutscher (1901) Baumann u. Hines (1917), Kutscher u. Ackerman (1931), Thomas u. Goerne (1918) und Felix u. Müller (1928) übereinstimmt, dass Kreatin und Arginin bei Wirbeltieren sowie bei Wirbellosen ineinander übergehen können, und zwar das Arginin eine Muttersubstanz des Kreatins sei. Weiter soll nach Gross u. Steenbock (1921) u. Iseke (1921) die Kreatinbildung durch Fütterung mit

Schilddrüsenpräparaten angeregt werden. Der reichliche Gehalt an Kreatin im Muskel spricht also dafür, dass das Arginin vollständig zu Kreatin und dies zum Teil weiter zu Methylguanidin abgebaut werden dürfte, um den Stoffwechsel bzw. den Kalkstoffwechsel aufrecht zu erhalten.

Das Fehlen von Carnosin im Salamandermuskel, welches als normaler Bestandteil des Wirbeltiermuskels bekannt ist, beruht höchstwahrscheinlich auf seiner Spaltung in β -Alanin u. Histidin, welche beide dem Stoffumsatz dienen.

Es ist auch bekannt, dass der Nucleinstoffwechsel im Amphibienorganismus lebhaft vor sich geht, wie Scaffidi (1911) beobachtet hat, was mit meinem Ergebnis fast übereinstimmt.

LITERATUR.

- Baumann, L. u. Hines, H. M. (1917): J. biolog. Chem., **31**, 540.
 Benech, E. u. Kutscher, F. (1901): Z. physiol. Chem., **32**, 278.
 Collip, J. B. (1925): J. biolog. Chem., **63**, 395.
 Engeland, R. (1903): Z. physiolog. Chem., **57**, 49.
 Felix, K. u. Müller, H. (1928): Z. physiolog. Chem., **174**, 112.
 Gross, E. G. u. Steenboek, H. (1921): J. biolog. Chem., **47**, 45.
 Henderson, P. S. (1918): J. physiologie, **52**, 5.
 Iseke, O. (1921): Monatsschr. f. Kinderheilk., **21**, 337.
 Jaffe, M. (1906): Z. physiolog. Chem., **48**, 430.
 Kossel, A. u. Patten, A. J. (1903): Z. physiolog. Chem., **38**, 39.
 Kutscher, F. (1906): Z. physiolog. Chem., **48**, 424.
 Kossel, A. u. Gross, R. E. (1924): Z. physiolog. Chem., **135**, 167.
 Kutscher, F. u. Lohmann, A. (1906): Z. physiolog. Chem., **49**, 81.
 Koch, W. F. (1913): J. biolog. Chem., **15**, 43.
 Kutscher, F. u. Ackermann, D. (1931): Z. physiolog. Chem., **199**, 266.
 Makino, H. (1933): J. Bioch., **18**, 387.
 McCallum, u. Voegtlin (1909): J. exp. Med., **11**, 118.
 Poller, K. (1926): Ber. d. dtsh. Chem. Ges., **59**, 1927.
 Paton, N. u. Sharpe, J. S. (1927): Zitiert nach F. Poos: Ber. Ges. Physiol., **41**, 83.
 Sibuya, S. (1931): J. Bioch., **14**, 111.
 Shimizu, T. (1921): Bioch. Z., **117**, 252.
 Scaffidi, V. (1911): Bioch. Z., **33**, 247.
 Tuzioka, S. (1935): J. Bioch., **22**, 123.
 Thomas, K. (1918): Z. physiolog. Chem., **104**, 73.
 Watanabe, C. K. u. Goerne, M. G. H. (1917): J. biolog. Chem., **33**, 253.
 „ (1918): **34**, 51.
 „ (1918): **36**, 531.

ÜBER EINIGE CHOLEINSÄUREN.

VON

KAZUMI YAMASAKI

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut zu Okayama,
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 12. Februar 1935)

Die Umwandlung des Carotin in Vitamin A im Tierorganismus, die zuerst von T. Moore (1929) mitgeteilt wurde, ist neuerdings von vielen Seiten, u. a. von R. Kuhn und seinen Mitarbeitern (1933) bestätigt worden, aber es bedarf dabei der Voraussetzung, dass dieser in Wasser unlösliche Kohlenwasserstoff im Darmkanal nicht direkt, sondern mit den Gallenbestandteilen, bes. mit denen der Desoxycholsäurereihe nach dem Choleinsäure-Prinzip Wielands resorbiert wird.

Nun habe ich experimentell geprüft, ob das β -Carotin — dieses wichtige Material wurde mir von Prof. Dr. W. Sugimoto freundlichst überlassen, wofür ich an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank aussprechen möchte — mit Desoxycholsäure eine präparative Molekularverbindung bilden kann; der Versuch war jedoch leider vergeblich.

Nach der wertvollen Arbeit von H. Rheinboldt (1927, 1929) soll die Form des Auftauschmelzpunktdiagramms zwischen der Gallensäure und anderen organischen Verbindungen ein ausschlaggebendes Merkmal für die Frage darstellen, ob sie eine Molekularverbindung bilden können oder nicht. Nun zeigt es sich auf Grund eines Zustanddiagramms von Desoxycholsäure und β -Carotin, dass die beiden Komponenten eine Molekularverbindung vom Schmelzpunkt 167°C bilden können und dass die Desoxycholsäure in dieser Verbindung 74% darstellt. Das Verhältnis von Gallensäure und Carotin ist also 4:1, und die β -Carotin-Choleinsäure dürfte demnach in der Formel $\text{C}_{40}\text{H}_{56} \cdot (\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_4)_4$ ausgedrückt werden, deren Bindung aber so überaus locker ist, dass sie schon durch Umkrystallisieren aus dem Lösungsmittel in ihre Komponenten

zerlegt wird.

Der gesättigte, aliphatische Alkohol, Batylalkohol $C_{21}H_{44}O_3$, der von M. Tsujimoto u. Y. Toyama (1922) im Lebertran von verschiedenen Fischarten entdeckt wurde, wurde als ein Glycerin-äther des Oktadecylalkohols von I. M. Heilbron und seinen Mitarbeitern (1930) sichergestellt. Nicht ohne Interesse ist es daher zu studieren, wie dieser höhere Alkohol sich mit der Desoxycholsäure verbinden kann, weil die Choleinsäure der Alkohole sehr wenig bekannt ist. (Wieland, 1916; Rheinboldt, 1929; Shimizu, 1929).

Wenn man die Desoxycholsäure in die alkoholische Lösung der unverseifbaren Anteile von einer Art Lebertran hineintut, so wird ein Gemisch von mehreren Choleinsäuren der höheren Alkohole gewonnen. Hervorheben muss man hierbei, dass dieses Gemisch doch hauptsächlich aus Selachylalkohol (1922)-Choleinsäure besteht. Und zwar hat man aus einer Fraktion vom Schmelzpunkt $185^{\circ}C$ durch Behandlung mit Xylol ein neutrales Komponent gewonnen, das durch katalytische Hydrierung einen Batylalkohol vom Schmelzpunkt $68-69^{\circ}C$ lieferte.

Das Zustandsdiagramm der Desoxycholsäure und des hier erhaltenen Batylalkohols wies darauf hin, dass sie im Verhältnis von 1:8 (90,1% Desoxycholsäure) eine Molekularverbindung vom Schmelzpunkt $186,5^{\circ}C$ liefern können. Tatsächlich gelang es mir auch, die Batylalkohol-Choleinsäure $C_{21}H_{44}O_3 \cdot (C_{24}H_{40}O_4)_8$ vom Schmelzpunkt $186-187^{\circ}C$, $[\alpha]_D^{25} + 47,37^{\circ}$ (in Alkohol), präparativ darzustellen.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

β -Carotin-Choleinsäure.

Zustandsdiagramm (Fig. 1). *β -Carotin*: Schmelzpunkt u. Auftaupunkt: 179° (unkorr.)* u. $173^{\circ}C$; *Desoxycholsäure*: Schmelz-

*) Der korrigierte Schmelzpunkt nach Prof. Sugimoto $181-182^{\circ}C$; da bei der Schmelzpunktbestimmung sich der Krystallrest in der gefärbten Schmelze nicht erkennen lässt, so wurde der Punkt, bei dem das Niveau der Schmelze plötzlich absinkt, als Schmelzpunkt angegeben.

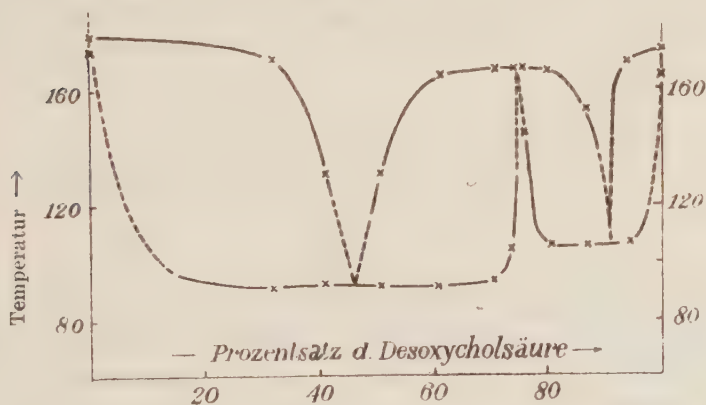
punkt u. Auftaupunkt: 173° u. 167°C.

Nachdem das gut gemischte Gemisch beider Komponenten auf kleiner Flamme zum Schmelzen gebracht worden war, zerkleinerte man die mehr oder weniger rötlich gefärbte Schmelze und mäss dann den Auftau- und Schmelzpunkt genau nach der Vorschrift von Rheinboldt aus.

Aus der unten stehenden Tabelle ist ersichtlich, dass die Eutektika bei 86° und 107°C liegen und sich bei 74% von Desoxycholsäure (Desoxycholsäure: β -Carotin=4:1) eine Molekularverbindung zu bilden scheint.

% d. Desoxy.	0	32,1	41,2	50,5	61,5	70,6	74,3	75,0	81,8	87,5	94,0	100
Auftau-pt.	173°	86°	87°	86°	86°	87°	106°	143°	107°	107°	107,5°	167°
Schmelz-pt.	179°	171°	132°	131°	165°	167°	167°	165°	166°	143°	170°	173°

Fig. 1.



Batylalkohol aus der Choleinsäure vom Schmelzpunkt 185°C.

In 580 cem absolutem Alkohol (wenig Wasser zugesetzt) wurden 5,8 g unverseifbare Anteile des Lebertrans und dann 29 g Desoxycholsäure (krystallalkoholhaltig) gelöst; darauf wurde die Lösung auf dem Wasserbade abgedampft und im Exsikkator

getrocknet; der Rückstand wurde in 5 facher Menge Alkohol gelöst und mit der gleichen Menge Wasser versetzt. Das dabei abgeschiedene Krystallinat wurde abgenutscht und gut getrocknet. Der kanariengelb gefärbte Rückstand (ca. 28 g) wurde mit absolutem Äther gewaschen, bis der Waschäther nicht mehr anfärbte; danach wurde er aus dem Alkohol-Wasser mehrmals umkrystallisiert, wobei der Schmelzpunkt anfangs bei 183°, endlich bleibend bei 184–185°C lag. Vier- oder sechseckige Tafeln.

Titration: 52,3, 59,2 mg Subst.: 1,255, 1,415 ccm *N*/10 KOH.

Äquivalent für $C_{21}H_{42}O_3 \cdot (C_{24}H_{40}O_4)_8$ Ber. 433.

für $C_{21}H_{44}O_3 \cdot (C_{24}H_{40}O_4)_8$ Ber. 435.

Gef. 423, 418.

Analyse: 1 g Choleinsäure wurde mit 8 ccm Xylol 2 Stunden gekocht, wobei die Xylolcholeinsäure abgeschieden wurde. Diese wurde abgenutscht, mit Petroläther dreimal gewaschen, getrocknet und gewogen. Die Mutterlauge der Xylolcholeinsäure wurde durch Wasserdampfdestillation abgedampft und ausgeäthert. Die Ätherschicht wurde mit Natriumsulfat getrocknet, abgedampft und als Alkoholfraktion gewogen. Die Menge der Xylolcholeinsäure bzw. des Batyl- oder Selachylalkohols ist in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

	Xylolcholeinsäure	Batyl- od. Selachylalkohol
für $O_{21}H_{42}O_3 \cdot (C_{24}H_{40}O_4)_8$	Ber. 1,02 g	0,098 g
od. $C_{21}H_{44}O_3 \cdot (C_{24}H_{40}O_4)_8$	Gef. 1,05, 1,00 g	0,111, 0,085 g

5 g Choleinsäure (Fp 185°C) wurden mit 40 ccm Xylol auf dem Sandbade eine Stunde gekocht, nach dem Erkalten wurde die abgeschiedene Xylolcholeinsäure abgenutscht und mit Petroläther gewaschen. Aus dem vereinigten Filtrat wurde eine weisse, wachsartige Masse nach der obenerwähnten Methode erhalten. Diese Masse wurde mit Aceton digeriert und in zwei Teile zerlegt. Aus dem Filtrat wurde nach dem Abdampfen des Lösungsmittels 0,4 g harzige Masse gewonnen. Diese wurde in 10 ccm Eisessig

gelöst und mit Pd-Schwarz bei 10–12°C zur Hydrierung gebracht; der dabei abgeschiedene Krystallbrei wurde unter Wasserzusatz ausgeäthert, die ätherische Schicht mit verdünnter Sodalösung und dann mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und abgedampft. Der Rückstand (0,4 g) wurde aus Methanol mehrmals umkrystallisiert. Zu Rosetten gruppierte, wachsartig glänzende Nadelchen vom Schmelzpunkt 68–69°C, genau wie beim Batylalkohol.

4,924, 4,893 mg Subst.: 13,250, 13,125 mg CO₂, 5,670,
5,640 mg H₂O.

C₂₁H₄₄O₃ Ber. C 73,18 H 12,91.

Gef. „ 73,42 „ 12,88.

„ 73,28 „ 12,92.

Diese Krystalle sind in den meisten kalten Lösungsmitteln schwer, aber den warmen ziemlich leicht löslich. Das Phenylurethan dieses Alkohols wurde in der üblichen Weise dargestellt und schmilzt bei 93–96°C, wie das des Batylalkohols.

Der oben erwähnte, in Aceton unlösliche Stoff (0,1 g) schmolz bei 56–58°C und nach dem Umkrystallisieren aus Äthanol bei 66–67°C.

5,223, 5,242 mg Subst.: 14,005, 14,070 mg CO₂, 5,980,
5,990 mg H₂O.

C₂₁H₄₄O₃ Ber. C 73,18 H 12,91.

Gef. „ 73,29 „ 12,84.

„ 73,38 „ 12,81.

Mit dem durch katalytische Reduktion erhaltenen Bathylalkohol zeigen diese Krystalle keine Mischschmelzpunktdepression, die anderen Eigenschaften stimmten gut mit denen des hydrierten Alkohols überein.

Batylalkohol-Choleinsäure.

Das Zustandsdiagramm (Fig. 2) zwischen Desoxycholsäure und Batylalkohol.

Batylalkohol: Schmelzpunkt und Auftaupunkt: 71° u. 69°C;

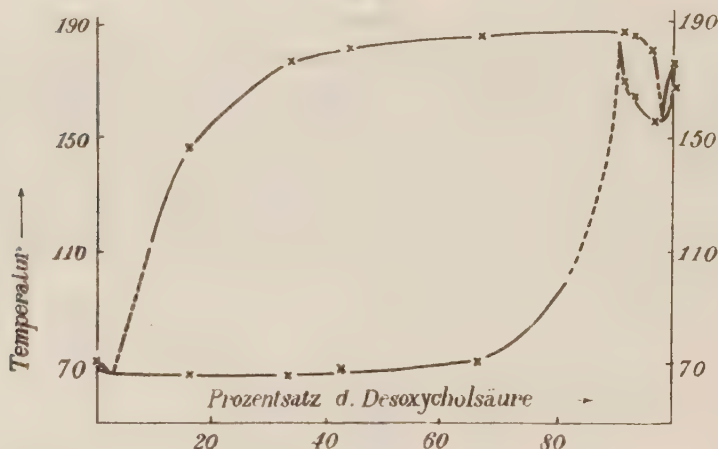
Desoxycholsäure: Schmelzpunkt u. Auftaupunkt: 173° u.

167°C).

% der Desoxychol.	0	17,4	32,9	42,0	66,3	90,4	91,7	95,7	100
Auftau-pt.	69°	68°	68°	70°	71°	168,5°	165°	156°	167°
Schmelz-pt.	71°	146°	177°	181°	185°	186,5°	185°	181°	173°

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass die Eutektika dieser Verbindung bei 68° u. 156°C liegen und beide Komponenten eine Molekularverbindung vom Schmelzpunkt 186,5°C im Verhältnisse von 1:8 (90,1% Desoxycholsäure) bilden können.

Fig. 2.



Präparative Darstellung der Batylalkohol-Choleinsäure.

50 mg Batylalkohol wurden mit 500 mg Desoxycholsäure (krystallalkoholhaltig) gut vermischt, unter Erwärmen in 3 ccm Alkohol gelöst und mit Wasser versetzt. Die so krystallisierte Verbindung wurde abgenutscht und schmolz bei 184–185°C. Ausbeute 0,5 g. Aus dem verdünnten Alkohol wurde sie einige Male umkrystallisiert und schmilzt bleibend bei 186–187°C (sintert bei 184°C), genau wie beim Zustanddiagramm. Sie löst sich ziemlich schwer in Äthanol, Aceton, Eisessig, kaum in Ather und Petrol-

ather wie es auch bei der übrigen Choleinsäure der Fall ist.

Titration 65,4, 66,1 mg Subst. 1,45, 1,50 ccm $N/10$ NaOH

Äquivalent für $C_{21}H_{44}O_8 \cdot (C_{24}H_{40}O_4)_x$ Ber. 435.

Gef. 451, 441.

Spezifische Drehung: 0,1066 g Subst. in 10 ccm abs. Alkohol.
2 dm, $\alpha = +1,01^\circ$. $[\alpha]_D^{20} = +47,37^\circ$.

LITERATUR.

- Brockmann H u Tecklenburg, M. (1933): Z. f. physiol. Chem., **221**, 117.
Davis, G. G., Heilbron, I. M. u Owens, W. M. (1930): J. Chem. Soc. London, 2542.
Kuhn, R. u. Brockmann, H. (1933): Z. f. physiol. Chem., **221**, 129.
Moore, T. (1929): Biochem. J., **23**, 803.
Rheinboldt, H. u. Zervas, P. (1927): Liebigs Ann. **451**, 256.
Rheinboldt, H. (1929): Z. f. physiol. Chem., **180**, 180.
Shimizu, T. u. Hatakeyama, T. (1929): Z. f. physiol. Chem., **182**, 57.
Tsujimoto, M. u. Toyama, Y. (1922): Chem. Umschau, **29**, 27, 35, 43.
Wieland, H u. Sorge, H. (1916): Z. f. physiol. Chem., **98**, 1.

ÜBER DIE ZUCKERAUSSCHIEDUNGSSCHWELLE DES KANINCHENS BEI ZUFUHR VON TONSILLENEXTRAKT.

VON

CHIKARA TATEISHI.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut Okayama,
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 12. Februar 1935)

Obwohl nach Caldera (1913) u. Suko (1927) die Tonsille nur ein lymphatisches Organ sein soll, wird neuerdings von Kostyál (1931) und Gärtner u. Kostyál (1931) behauptet, dass sie eine innersekretorische Drüse sei, da der Tonsillenextrakt vom Schwein eine den Blutdruck des Kaninchens senkende Substanz enthält. Sich diesen Autoren ausschliessend haben Voss (1929) und Griebel (1931) gefunden, dass das Wachstum der Kaulquappe durch Tonsillenextrakt und das des Hühnchens durch Fütterung mit Tonsillen beträchtlich gehemmt wird.

Nach ihnen soll diese das Wachstum hemmende Substanz eine Art von Phosphatid sein, die nach Griebel (1931) auch das Wachstum der Ratten stark hemmen kann. Was die Beziehung zwischen den Funktionen der Tonsillen und der anderen innersekretorischen Drüsen anbetrifft, so soll nach Busacca (1919) die Tonsille des Hundes durch Thyreoparathyreoidektomie verkleinert und die Zahl u. das Volumen des Follikels vermindert werden, wobei das adenoide Grundgewebe vermehrt wird und nach Jastrebowa (1931) soll durch Tonsillektomie nicht nur das Wachstum des Ferkels gehemmt werden, sondern auch ein Hyperthyreoidismus zu Tage treten.

Daher wird neuerdings im allgemeinen die Tonsille als eine innersekretorische Drüse betrachtet. Infolgedessen ist es interessant, die Beziehung zwischen der Tonsillenwirkung und dem Stoffwechsel zu erforschen.

Im Jahre 1921 wurde bereits von Farmachidis der Einfluss

des Tonsillenextraktes auf den Zuckerstoffwechsel untersucht und gefunden, dass die Glykosurie des pankreasdiabetischen Hundes und die Aderenalinglykosurie des Hundes durch die parenterale Zufuhr von Tonsillenextrakt des Ochsen stark herabgesetzt wird.

Dagegen wird nach Bruzzone (1926) der Zuckerstoffwechsel durch den Tonsillenextrakt, der mittelst der Darstellungsmethode des Insulins nach Dudley u. Starling bereitet wurde, gar nicht beeinflusst. Somit soll nach ihm die Tonsille kein Hormon produzieren.

Neuerdings wurde von Kostyál bewiesen, dass durch subcutane Zufuhr des Extraktes von Schweinetonsillen unter Blutdrucksenkung eine Hypoglykaemie u. Leucopenie auftritt, und dass diese Hypoglykaemie nach Kostyál (1933) durch die direkte Wirkung des Hormons im Tonsillenextrakt auf das Leberpankreas-system und durch vermehrte Glykogenie zustande kommt.

Nach Tominaga soll aber die Glykogenie der Leber des Kaninchens durch Zufuhr des Tonsillenextraktes vom Menschen stark herabgesetzt und durch Mitzufuhr von Cholsäure wieder gesteigert werden, während sie durch Mitzufuhr von Insulin stark vermindert wird.

Auf Grund dieser Daten hat Tominaga dabei behauptet, dass im Tonsillenextrakt des Menschen ein Hormon vorhanden ist, welches wie das Insulin die Zuckerverbrennung im Organismus fördern könnte.

Seit den Untersuchungen von Bissinger u. Lesser (1926), Noorden u. Issac (1924), Nakamura (1926) und Sato (1929) ist allgemein bekannt, dass die Glykogenie der Leber durch Insulin von seinem jeweiligen Mengenverhältnis und von dem Zuckergehalt in der Leber abhängig ist, und nach Sato (1929) soll die verminderte Glykogenie der Leber bei Zufuhr von Insulin unter vermehrter Glykogenolyse auf der durch Insulin gesteigerten Zuckerverbrennung beruhen.

Somit müsse wohl die Zuckerassimilation durch Tonsillenextrakt je nach seinem Mengenverhältnis gefördert oder herabgesetzt werden, wenn im Tonsillenextrakt eine dem Insulin ähnliche Substanz enthalten wäre.

In diesem Sinne habe ich den Einfluss des Tonsillenextraktes vom Schwein auf die Z.A.S. des Kaninchens untersucht.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Zum Versuch wurden kräftige, gut erwachsene, männliche Kaninchen verwendet. Zuerst wurde als Kontrolle die Z.A.S. dieser Kaninchen nach Sakaguchi bestimmt, dann 0,2 ccm oder 1,0 ccm eines Tonsillenextraktes vom Schwein pro Kilo oder mit diesem gleichzeitig 3 ccm einer 1%igen Na-Cholatlösung pro Kilo subcutan verabreicht und die Z.A.S. dieser Kaninchen in gleicher Weise bestimmt.

Bei der Bestimmung der Z.A.S. wurde den Kaninchen immer 2,0 g Glukose pro Kilo per os verabreicht und der Blutzucker-gehalt nach Hagedorn-Jensen, der Harnzuckergehalt nach Bertrand bestimmt.

Die Tonsillenextraktlösung vom Schwein wurde nach Fuzi-wara (1932) bereitet.

Die Resultate sind in den Tabellen I–VII zusammengestellt.

ERGEBNISSE.

Wie aus den Tabellen I–VII ersichtlich ist, beträgt die Z.A.S. des normalen Kaninchens 0,25–0,30% und die bei Zufuhr von Tonsillenextrakt: bei 0,2 ccm pro Kilo 0,22–0,27%, bei 1,0 ccm pro Kilo 0,29–0,32%.

Die Z.A.S. des normalen Kaninchens wird also durch die Zufuhr einer kleineren Menge Tonsillenextrakt herabgesetzt, dagegen durch die einer grösseren gesteigert.

Die Zuckerassimilation wird also durch eine kleinere Menge Tonsillenextrakt gesteigert, durch eine grössere dagegen gestört.

Bei Zufuhr von Tonsillenextrakt, 0,2 ccm pro Kilo, mit 3,0 ccm einer 1%igen Cholatlösung pro Kilo beträgt die Z.A.S. 0,21–0,25%; sie wird also stärker herabgesetzt als bei Zufuhr von Tonsillen-extrakt allein.

Aus diesem Ergebnis lässt sich ersehen, dass der Tonsillen-extrakt nicht nur die Zuckerverbrennung, wie Tominaga (1934) behauptet, sondern auch die Zuckerassimilation zu fördern scheint.

Versuch I (K.G. 2340)

Dat. 1933	Harnmenge (ccm)			Blutzucker % (Harnzucker %)					Z.A.S. %	Bemerk.
	1	2	3	Vor	nach Stunden					
					½	1	1½	2		
8/3	12	17	6	0,091	0,169	0,191 (-)	0,244	0,269 (0,1)	0,207 (spur)	0,27
11/„	8	35	15	0,103	0,187	0,211 (-)	0,261	0,223 (spur)	0,185 (s. spur)	0,26
17/„	3	17	8	0,106	0,176	0,190 (-)	0,237	0,208 (spur)	0,150 (-)	0,24 ← Tonsillenext. 0,2 ccm
20/„	5	10	4	0,094	0,199	0,233 (-)	0,270	0,254 (spur)	0,198 (s. spur)	0,27
23/„	10	8	5	0,098	0,162	0,180 (-)	0,209	0,212 (spur)	0,151 (-)	0,21 Tonsillenext. ← 0,2 ccm u. Cholatios. 3 ccm
27/„	5	11	9	0,094	0,202	0,275 (spur)	0,293	0,309 (0,45)	0,251 (spur)	0,27

Tonsillenext.
← 0,2 ccm

Tonsillenext.
← 0,2 ccm u. Cholatib.
3 ccm

Versuch II (K.G. 1670)

Dat. 1933	Harnmenge (cem)			Vor	Blutzucker % (Harnzucker %)				Z.A.S. %	Bemerk.	
	nach Stunden										
	1	2	3		$\frac{1}{2}$	1	1½	2			3
10/III	8	4	2	0,102	0,219	0,261 (—)	0,285	0,279 (0,86)	0,230 (spur)	0,28	
20/ „	3	5	3	0,107	0,222	0,256 (s. spur)	0,275	0,224 (spur)	0,198 (—)	0,27	← Tonsillenext. 0,2 cem
23/ „	7	10	2	0,100	0,228	0,298 (spur)	0,237	0,196 (spur)	0,147 (—)	0,29	
26/ „	2	6	5	0,106	0,192	0,253 (spur)	0,240	0,202 (spur)	0,128 (—)	0,25	Tonsillenext. ← 0,2 cem. n Cholatlös. 3 cem
30/ „	11	13	10	0,099	0,217	0,262 (—)	0,290	0,245 (0,15)	0,153 (—)	0,29	

Versuch III (K.G. 2080)

13/III	5	25	10	0,097	0,218	0,268 (spur)	0,311	0,292 (0,51)	0,224 (s. spur)	0,27	
16/ „	14	17	5	0,099	0,144	0,150 (—)	0,174	0,170 (—)	0,116 (—)	0,26	← Tonsillenext. 0,2 cem
19/ „	9	17	23	0,102	0,155	0,215 (—)	0,257	0,245 (spur)	0,211 (s. spur)	0,26	← Tonsillenext. 0,2 cem
22/ „	4	4	9	0,094	0,192	0,256 (—)	0,278	0,308 (2,22)	0,276 (1,73)	0,28	

Versuch IV (K.G. 2400)

Dat. 1933	Harmenge (cem)			Blutzucker % (Harnzucker %)					Z.A.S. %	Bemerk.	
	1	2	3	Vor	nach Stunden						
					1	1½	2	3			
9/III	5	16	10	0,100	0,187 (0,25)	0,301	0,289 (0,29)	0,291 (0,29)	0,223 (spur)	0,29	
12/ "	7	10	10	0,099	0,224	0,245	0,280 (spur)	0,192 (0,17)	0,115 (-)	0,28	
15/ "	7	5	12	0,097	0,241	0,247	0,272 (0,3)	0,224 (0,37)	0,138 (spur)	0,27	Tonsillenext. ← 0,2 cem
18/ "	4	15	13	0,111	0,235	0,262	0,278 (spur)	0,205 (0,13)	0,124 (-)	0,28	
24/ "	5	18	8	0,117	0,219	0,238	0,252 (spur)	0,185 (s. spur)	0,114 (-)	0,25	Tonsillenext. ← 0,2 cem u. (holatlös, 3 cem
29/ "	8	13	12	0,100	0,239	0,272	0,288 (spur)	0,171 (spur)	0,111 (-)	0,23	
4/V	4	5	3	0,096	0,258	0,319	0,264 (-)	0,284 (0,69)	0,181 (0,48)	0,32	Tonsillenext. ← 1,0 cem
9/ "	8	10	2	0,098	0,255	0,286	0,274 (0,31)	0,250 (0,78)	0,171 (spur)	0,27	

Versuch V (K.G. 2100)

Dat. 1933	Harnmenge (cem.)			Vor	Blutzucker % (Harnzucker %)				Z.A.S. %	Bemerk.
	1	2	3		nach Stunden					
					1	1½	2	3		
28/III	8	20	17	0,093	0,197 (-)	0,249 (-)	0,272 (0,35)	0,233 (spur)	0,27	
4/IV	5	14	15	0,103	0,140 (-)	0,204 (-)	0,240 (0,27)	0,265 (0,52)	0,26	
7/ "	14	40	20	0,092	0,192 (0,41)	0,224 (-)	0,252 (0,65)	0,238 (0,40)	0,22	Tonsillenext. ← 0,2 cem
10/ "	12	30	20	0,096	0,154 (-)	0,207 (-)	0,260 (0,26)	0,231 (0,19)	0,26	Tonsillenext. ← 0,2 cem u. Cholatioes, 3 cem
14/ "	4	17	21	0,088	0,139 (-)	0,166 (-)	0,208 (0,11)	0,273 (0,18)	0,24	
1/V	16	26	22	0,087	0,212 (-)	0,233 (-)	0,260 (0,47)	0,245 (spur)	0,26	
7/ "	10	17	20	0,094	0,209 (-)	0,252 (-)	0,294 (2,19)	0,280 (0,24)	0,29	Tonsillenext. ← 1,0 cem
11/ "	5	20	20	0,094	0,190 (-)	0,230 (-)	0,268 (0,28)	0,211 (0,13)	0,27	

Versuch VI (K.G. 2470)

Dat. 1933	Harnmenge (ccm)			Blutzucker % (Harnzucker %)					Z.A.S. %	Bemerk.	
				Vor	nach Stunden						
	1	2	3		1	1½	2	3			
9/IV	5	13	4	0,099	0,177 (-)	0,246 (-)	0,275 (-)	0,287 (0,20)	0,225 (-)	0,28	
17/ "	4	8	3	0,094	0,175	0,223 (-)	0,261	0,242 (0,31)	0,229 (spur)	0,26	← Tonsillenext. 0,2 ccm
3/V	11	8	9	0,094	0,196	0,231 (-)	0,284	0,270 (0,61)	0,264 (0,41)	0,28	
7/ "	15	4	6	0,100	0,142	0,189 (-)	0,231	0,258 (0,48)	0,298 (1,65)	0,23	Tonsillenext. ← 0,2 ccm u. Cholatlös. 3 ccm
12/ "	5	12	5	0,101	0,216	0,262 (0,38)	0,292	0,326 (1,05)	0,286 (1,15)	0,26	
16/ "	5	6	7	0,094	0,212	0,294 (0,25)	0,315	0,335 (0,82)	0,342 (2,40)	0,29	← Tonsillenext. 1,0 ccm
21/ "	7	25	12	0,092	0,209	0,264 (0,32)	0,298	0,292 (0,65)	0,276 (0,62)	0,26	

Versuch VII (K.G. 1930)

Dat. 1933	Harnmenge (ccm)			Blutzucker % (Harnzucker %)					Z.A.S. %	Bemerk.	
				Vor	nach Stunden						
	1	2	3		½	1	1½	2			3
27/III	7	22	11	0,101	0,152 (-)	0,219 (-)	0,236 (spur)	0,255 (spur)	0,208 (-)	0,25	
30/ "	9	18	11	0,088	0,184 (-)	0,239 (-)	0,243 (spur)	0,253 (spur)	0,179 (-)	0,25	
5/IV	5	25	20	0,090	0,163 (0,39)	0,240 (0,39)	0,263 (0,65)	0,273 (0,65)	0,244 (0,27)	0,24	← Tonsillenext. 0,2 ccm
9/ "	3	24	3	0,088	0,168 (-)	0,223 (-)	0,261 (0,47)	0,287 (0,47)	0,255 (0,83)	0,26	
16/ "	6	43	5	0,092	0,184 (spur)	0,238 (spur)	0,257 (0,34)	0,265 (0,34)	0,206 (0,40)	0,24	Tonsillenext. ← 0,2 ccm u. Cholatlös. 3 ccm
2/V	13	17	18	0,091	0,188 (-)	0,241 (-)	0,243 (spur)	0,274 (spur)	0,207 (spur)	0,27	
5/ "	2	10	15	0,091	0,209 (-)	0,258 (-)	0,296 (0,44)	0,282 (0,44)	0,196 (spur)	0,29	← Tonsillenext. 1,0 ccm
8/ "	15	20	30	0,101	0,189 (-)	0,220 (-)	0,243 (spur)	0,274 (spur)	0,131 (spur)	0,27	

Bei Zufuhr einer kleineren Menge Tonsillenextrakt muss also die Zuckerassimilation vorherrschen, infolgedessen die Z.A.S. herabgesetzt wird, während bei einer solchen einer grösseren Menge die Zuckerverbrennung vorherrscht und dabei eine Erhöhung der Z.A.S. eintritt, wie Eda (1927) es bei Insulin beobachtet hat.

Die Cholsäure fördert bekanntlich die Glykogenie der Leber und hemmt die Zuckerverbrennung im Organismus, was letzteres von Hatakeyama (1930) u. Uraki (1933) bewiesen wurde.

Somit dürfte wohl die Herabsetzung der Z.A.S. bei Zufuhr von Cholsäure u. Tonsillenextrakt auf der gesteigerten Zuckerassimilation im Kaninchenorganismus beruhen, wobei die die Zuckerverbrennung fördernde Wirkung des Tonsillenextraktes durch Cholsäure hemmend beeinflusst werden könnte, was eine vermehrte Glykogenie zur Folge haben müsste.

Der Tonsillenextrakt scheint mir eine hormonale Wirkung zu haben, da er die Glykogenie und Glykolyse fördern kann, welche erstere durch Cholsäure gesteigert zu werden scheint.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Z.A.S. des Kaninchens wird durch die Zufuhr einer kleinen Menge von Tonsillenextrakt des Schweines herabgesetzt, dagegen durch die einer grösseren Menge erhöht.

2. Die durch Tonsillenextrakt herabgesetzte Z.A.S. wird durch Zufuhr von Cholsäure weiter herabgesetzt.

Aus diesen Daten geht hervor, dass der Tonsillenextrakt die Zuckerassimilation fördert.

LITERATUR.

- Bissinger, E. u. Lesser, E. T. (1926): *Bioch. Zschr.*, **168**, 398.
 Bruzzone (1926): *Ronas Berichte*, **36**, 823.
 Busacca, G. (1929): *Arch. ital. Otol.*, **40**, 519.
 Caldera, C. (1913): *Semons Internat. Zentralbl. f. Laryngol.*, **29**, 15.
 Eda, G. (1927): *Jl. Bioch.*, **7**, 53.
 Farmachidis, G. B. (1921): *Ronas Berichte*, **7**, 568.
 Fuziwara, K. (1932): *Bioch. Zschr.*, **256**, 384.
 Gärtner st. u. Kostyál, L. (1931): *Schmiedebergs Arch.*, **159**, 408.
 Griebel, K. (1931): *Arch. f. Ohren-Nasen- u. Kehlkopfheilk.*, **129**, 255.
 „ (1929): „ „ **121**, 18.

- „ (1930): „ „ 124, 248.
- Hatakeyama, T. (1930): *Jl. Bioch.*, **11**, 273.
- Justrebowa, (1931): *M Schr. Ohrenheilk.*, **65**, 576.
- Kostyál, L. (1931): *Zs. exper. Med.*, **76**, 168.
- Kostyál, L. (1933): *Schmiedbergs Arch.*, **170**, 131.
- Noorden, C. u. Isaac, S. (1924): *Kl. Wschr.*, **a**, 720.
- Nakamura, T. (1926): *Nihon Naikagakkai Zasshi*, **13**, 270. (Japanisch).
- Sato, H. (1929): *Tohoku Jl. of exper. Med.*, **13**, 6.
- Suko, H. (1927): *Chosen Igakkai Zasshi*, Nr. 72, 1. (Japanisch).
- Tominaga, K. (1934): *Okayama Igakkai Zasshi*, **46** Jg. s. 386.
(Japanisch).
- Uraki, Z. (1933): *Jl. Bioch.*, **18**, 207.
- Voss, O. (1929): *Arch f. Ohren-Nasen- u. Kehlkopfheilk.*, **121**, 1.

ÜBER DIE ARGININABSPALTUNG BEI DEM PROTEOLYTISCHEN EIWEISSABBAU.

VON

SHIGEKAZU KAMIYA.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institute der Medizinischen Akademie
zu Chiba. Direktor: Professor S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 12. Februar 1935)

Die erfolgreichen Beiträge zur Erkenntnis der Chemie der Chemie der Eiweisstruktur ist ein Verdienst der modernen Proteasenforschung. Durch die Ermittlung der zuwachsenden Amino- und Carboxylgruppen haben Waldschmidt-Leitz und seine Mitarbeiter die fraktionierte enzymatische Hydrolyse der Protein ausgeführt. Es wurde damit festgestellt, dass die Aminosäure in den meisten natürlichen Proteinen durch ihre Carboxylgruppe mit der α -Aminogruppe von der anderen Aminosäure sich peptidisch verbindet, aber in der Galatine ausserdem auch mit der Aminogruppe des Prolins oder Oxyprolins. Das Vorkommen des Diketopiperazinrings in Proteinstruktur wurde aber wegen seiner Resistenz gegen die Proteasenwirkung lange bezweifelt und konnte erst kürzlich durch die Untersuchungen von Abderhalden und Schwab(1932), Matsui(1933), Ishiyama(1933) und Shibata (1934) wahrscheinlich gemacht werden.

Ebenso wie die Bindungsweise der Aminosäuren sind aber auch die Studien über die Anordnung der Aminosäuren in dem Eiweissmolekül für die Eiweisschemie sehr wichtig. Dieses Problem wurde bisher von zwei Seiten erforscht. Erstens haben die enzymatischen Versuche an den künstlich dargestellten Peptidverbindungen die Spezifität der Proteasen beträchtlich klargestellt. Man weiss nun, dass die Spezifität sowohl von der Länge der Peptidkette als auch von der chemischen Natur der daran teilnehmenden Aminosäure bedingt wird. Die weiteren Studien auf diesem Gebiet können zwar zur experimentellen Prüfung von jeder möglichen gegenseitigen Bindungsweise der Aminosäure beitragen, leider verspre-

ehen sie jedoch nicht die Feststellung der Bindungsreihe der Aminosäuren in den genuinen Eiweisskörpern. Daher ist die fermentative Forschung des Eiweisses von anderer Seite dringend erforderlich, nämlich die Isolierung und chemische Analyse von einzelnen Abbauprodukten, die bei der Proteolyse intermediär entstehen oder durch eine bestimmte Protease nicht weiter angegriffen werden können. An solchen Experimenten haften gewiss methodische Schwierigkeiten. Trotzdem wollten wir uns damit beschäftigen, und ich habe zuerst die Abspaltung des Arginins bei dem proteolytischen Eiweissabbau untersucht, um einen Ausgangspunkt für zukünftige Studien zu bekommen.

Hinsichtlich der Loslösung der Aminosäuren während der fermentativen Eiweisspaltung sind die Angaben von Abderhalden und Reinbold (1905), Abderhalden und Voegtlin (1907), Brown und Millar (1906), Plimmer und Eaves (1913) und Ragins (1928) vorhanden. Sie stimmen darin überein, dass Tyrosin und Tryptophan schon am Anfang der tryptischen Verdauung schnell und vollständig abgespalten werden. Hunter und Dauphinee (1930) hydrolysierten verschiedene Proteine mit Trypsin und bestimmten das abgespaltene Arginin durch die Arginase-Ureasmethode. Nach ihrer Angabe fand die Loslösung des Arginins nicht voll und ganz statt, aber schnell wie die des Tryptophans oder des Tyrosins und sie erreichte bei Edestin, Casein, Gelatine, Eialbumin und Wittepepton endlich an 80% des Gesamtarginingehalts. Die Autoren haben gleichzeitig das abgespaltene Arginin als Flavianat nach Kossels Methode bestimmt, aber seine Menge war jedesmal weniger als die fermentiv gemessene. Als die Erläuterung dieses Befundes wurden von ihnen zwei Möglichkeiten angegeben: Die durch die Arginase-Ureasmethode ermittelte Argininmenge schliesst ausser dem freien Arginin das noch peptidisch gebundene ein, oder die Löslichkeit des Argininflavianats wird in Anwesenheit der komplizierten Eiweissabbauprodukte weit erhöht und dadurch wird der Verlust eines Teils Arginin verursacht. Torbet und Bradley (1932) sollen bei Pepsinverdauung des Caseins und der Gelatine in 15 Tagen ein Entmasken von 20 resp. 5% des Gesamtarginins durch

Arginase-Ureasemethode bewiesen und bei der weiteren Trypsinwirkung auf die peptischen Hydrolysate von beiden Proteinen in 15 Tagen endlich 80%ige Argininspaltung beobachtet haben.

Bei vorliegendem Experiment wird durch die Arginase-Urease-methode die Argininspaltung während der Hydrolyse des Edestins, der Gelatine und des Caseins verfolgt. Proteolytische Fermente sind Pepsin, Trypsin und Erepsin. Eine hoch aktive Arginasenlösung kann man wohl in verschiedener Weise herstellen. Aber für den Zweck des vorliegenden Experiments ist es unbedingt nötig, dass die Fermentlösung frei von Proteasen ist. Nach verschiedenen Vorversuchen wurde endlich der Glycerinextrakt der Schweineleber als geeignetest ausgewählt. Dieser Extrakt ist hinsichtlich der Arginaseaktivität sehr haltbar, frei von der tryptischen Proteinase und der Dipeptidase, aber enthält eine ziemlich starke Polypeptidase und ist wirksam auf das Wittepepton und das peptische Edestinhydrolysat. Diese Polypeptidase konnte ich nicht durch die in verschiedener Weise erprobten Adsorptionsmethoden abtrennen, aber die Fermentlösung war als Arginase so hoch aktiv, dass sie selbst bei 50 facher Verdünnung wohl für die Argininbestimmung brauchbar war, soweit die zu bemessende Argininmenge wie in vorliegendem Experiment nicht beträchtlich gross ist, und damit ist man imstande bei 24 stündigen Versuchen die Wirkung der Polypeptidase praktisch auszuschalten. Die anderseits, z.B. durch Autolyse der Organe dargestellten Arginasenlösungen eigneten sich selbst nach verschiedenen Vorbehandlungen nicht dazu, unter Beibehaltung der brauchbaren Arginasenaktivität die Polypeptidasenwirkung auszuschliessen. Daher wurde der 50-fach verdünnte Glycerinextrakt die ganzen Versuche hindurch als Arginasenlösung gebraucht. Die optimale Azidität der Arginase ist nach Edlbacher (1924) Ph 9.5–9.8. Diese Angabe wurde bei dem Vorversuche bestätigt, aber auch zwischen Ph 9–9.6 war praktisch kein merklicher Aktivitätsunterschied zu beobachten. So habe ich, indem ich einerseits den hydrolytischen Grad des Eiweisses alkoholtitrimetrisch nach Willstätter verfolgte, anderseits auf das Eiweisshydrolysat, dessen weitere proteolytische Verdauung durch Erhitzen unterbrochen wurde, die oben erwähnte verdünnte

Arginaselösung bei Ph 9–9.5 24 Stunden lang einwirken gelassen. Die Arginasenwirkung wurde dann wieder durch Erhitzen unterbrochen und der abgespaltene Harnstoff weiter durch die Urease-methode bestimmt. In der nachstehenden Tabelle und dem experimentellen Teil wird die nach Van Slyke destillierte Ammoniakmenge in ccm $N/10$ angegeben. Die abgespaltene Argininmenge kann man daraus gleich errechnen. Die Reihenfolge der Proteasenwirkung war Pepsin-Trypsin-Erepsin oder Pepsin-Erepsin. Bei Edestin und Casein war die endliche Zunahme der titrierbaren Carboxylgruppe im Fall von Pepsin-Trypsin-Erepsin grösser als im Fall von Pepsin-Erepsin. Bei Gelatine waren sie aber gleich. Daher wird die Carboxylzunahme bei jeder Titration einheitlich für 1.67 ccm 10% Eiweisslösung umgerechnet, der maximale Wert der titrierten Carboxylzunahme bei den Pepsin-Trypsin-Erepsinversuchen bequemlichkeitshalber vorläufig als 100% geschätzt, und damit wird der proteolytische Grad in % angegeben. Die Argininabspaltung in % wird aus dem Gesamtarginingehalt ausgerechnet, das bei jedem Eiweiss an seinem Säurehydrolysat mittels Flavianatmethode bestimmt wurde. Der Arginingehalt der im Experimente gebrauchten Eiweisspräparate war bei Edestin 15.68%, bei Casein 3.71% und bei Gelatine 7.94%. Das Resultat des vorliegenden Experiments wird tabellarisch zusammen angegeben.

Was man aus dieser Tabelle ansehen kann, ist folgendes: Wenn man zuerst Pepsin auf Edestin bei Ph 2 einwirken lässt, so nimmt die freie Carboxylgruppe 14.6% zu, aber das Arginin kann nicht nachgewiesen werden. Torbet und Bradley (1932) haben mitgeteilt, dass das Arginin in Proteinen bei Pepsinverdauung entmaskiert werden soll, so dass eine Harnstoffabspaltung aus dem peptischen Hydrolysat durch Arginase zu beobachten sei. Diese Angabe kann aber bei dem Versuch mit dem Edestin nicht bestätigt werden. Das ist auch der Fall mit dem Casein und der Gelatine. Der positive Beweis der Harnstoffabspaltung obenerwähnter Autoren ist sicher darauf zurückzuführen, dass der gebrauchten Arginaselösung irgendeine genügend wirksame Protease beigegeben war. Wenn Trypsin auf das peptische Hydrolysat des Edestins bei Ph 8 wirkt, erreicht die Zunahme von COOH bis zu 66.5% und

A. EDESTIN.

 (a) *Pepsin-Trypsin-Erepsin.*

Protease	Wirkungs- dauer (Tage)	COOH-Zunahme		Argininspaltung	
		N/10 KOH (ccm)	%	N/10 NH ₄ OH (ccm)	%
Pepsin	1	1.08	8.6	-0.04	0
	2	1.22	9.6	0.02	0
	3	1.29	10.1	—	—
	4	1.47	11.6	-0.01	0
	5	1.54	12.1	—	—
	6	1.73	13.6	-0.01	0
	7	1.86	14.6	—	—
Trypsin	1	5.46	42.9	0.74	24.7
	2	5.96	46.9	0.73	24.3
	3	6.92	54.4	0.81	27.0
	4	7.26	57.1	0.80	26.7
	5	7.76	61.0	0.89	29.7
	7	8.46	66.5	0.91	30.0
Erepsin	1	10.12	79.6	1.41	47.1
	2	10.52	82.7	1.48	49.4
	3	11.22	88.2	1.43	47.7
	5	11.22	88.2	1.45	48.3
	7	11.62	91.4	1.43	47.7
	22	12.72	100.0	1.90	63.4

 (b) *Pepsin-Erepsin.*

Dasselbe peptische Hydrolysat wie beim Versuch (a) wird ohne die vorangehende Trypsineinwirkung durch Erepsin verdaut.

Wirkungsdauer d. Erepsins (Tage)	COOH-Zunahme		Argininspaltung	
	N/10 KOH (ccm)	%	N/10 NH ₄ OH (ccm)	%
1	4.16	32.7	0.94	31.4
2	6.26	49.2	1.28	42.7
3	7.36	57.9	1.55	51.7
4	8.36	65.7	1.74	58.4
5	9.22	72.5	1.79	59.5
7	9.96	78.3	1.87	61.9
8	9.96	78.3	—	—
18	10.76	84.6	2.25	76.4
22	10.92	85.9	2.37	79.0

B. CASEIN.

(a) *Pepsin-Trypsin-Erepsin.*

Protease	Wirkungs- dauer (Tage)	COOH-Zunahme		Argininspaltung	
		N/10 KOH (cem)	%	N/10 NH ₄ OH (cem)	%
Pepsin	6	3.20	21.8	0	0
	7	3.40	23.2	—	—
	8	3.95	26.9	0	0
Trypsin	7	10.78	73.4	—	—
	8	—	—	0.19	26.9
	9	11.03	74.5	—	—
	12	11.25	76.6	0.19	26.9
Erepsin	7	14.15	96.5	0.43	60.7
	12	14.56	99.2	0.43	60.7
	22	14.68	100.0	0.43	67.7

(b) *Pepsin-Erepsin.*

Wirkungsdauer d. Erepsins (Tage)	COOH-Zunahme		Argininspaltung	
	N/10 KOH (cem)	%	N/10 NH ₄ OH (cem)	%
7	11.06	75.3	—	—
8	—	—	0.47	67.8
12	12.53	85.4	0.68	96.1
15	12.97	88.4	—	—
19	—	—	0.68	96.1
23	13.77	93.8	—	—
24	—	—	0.71	100.0

C. GELATINE.

(a) *Pepsin-Trypsin-Erepsin.*

Protease	Wirkungs- dauer (Tage)	COOH-Zunahme		Argininspaltung	
		N/10 KOH (cem)	%	N/10 NH ₄ OH (cem)	%
Pepsin	6	0.97	9.2	0.01	0.7
	8	0.89	8.5	0.01	0.7
Trypsin	7	4.16	39.6	0.61	40.2
	10	4.55	43.3	0.66	43.5
	12	4.55	43.3	0.66	43.5
Erepsin	8	9.03	85.9	0.96	63.2
	22	10.51	100.0	1.22	80.4

(b) *Pepsin-Erepsin.*

Wirkungsdauer d. Erepsins (Tage)	COOH-Zunahme		Argininabspaltung	
	N/10 KOH (cem)	%	N/10 NH ₄ OH (cem)	%
7	7.23	68.8	0.80	52.7
12	8.69	84.6	1.01	66.3
22	10.83	103.0	1.39	91.6

dabei werden 30% des Gesamtarginins abgespalten. Die Argininzunahme ist stark (24.7%) am 1. Tage der Trypsinwirkung und wird schwächer während der folgenden 6 Tage. Lässt man weiter darauf Erepsin einwirken, so vermehrt sich naturgemäss die titrierbare Carboxylgruppe und zwar wieder bedeutend am Anfang der Verdauung. Die Argininzunahme ist auch stark am 1. Tage, dabei werden 17% des Gesamtarginins abgespalten. Wenn das Erepsin andererseits gleich nach der Pepsinverdauung einwirkt, so werden endlich insgesamt 86% derjenigen Carboxylgruppe frei gemacht, die aus dem Edestin durch Pepsin-Trypsin-Erepsin losgelöst wird, und es ist auch eine starke Argininzunahme zu bemessen. Es wird ausserdem beobachtet, dass die totale, mittels der Argininase-Urease-methode bestimmbare Argininmenge viel grösser ist, falls sich an die Pepsinverdauung des Edestins sofort die Erepsinwirkung schliesst, als wenn auf dasselbe peptische Hydrolysat Trypsin und dann Erepsin einwirken. Im ersterem Fall werden 79% und im letzterem 63% des Gesamtarginins losgelöst. Dieser Befund ist sehr auffallend, weil im Gegensatz zu der Argininabspaltung die totale Zunahme der Carboxylgruppe bei der Proteasenwirkung in der Reihenfolge Pepsin-Trypsin-Erepsin grösser ist als bei der Reihenfolge Pepsin-Erepsin. Eine Erklärung dafür kann zur Zeit nicht gegeben werden, aber man kann wenigstens sagen, dass das Edestin unter meiner Versuchsbedingung durch Pepsin, Trypsin und Erepsin in dieser Wirkungsreihenfolge nicht total aufgespalten wird, und ein Teil vom Gesamtarginin noch peptidisch gebunden bleibt. Bei der Pepsin-Erepsinwirkung, wo eine wenigere Carboxylzunahme zu messen ist, wird daher das Edestin selbstverständlich

nicht total hydrolysiert, aber die gefundene grössere Argininausbeute als bei der Pepsin-Trypsin-Erepsinwirkung mag vorläufig so gedeutet werden, dass das Loslösen des Arginins aus den Polypeptidenketten durch die direkte Wirkung des Erepsins (Aminopolypeptidase + Dipeptidase) unter Umständen viel leichter stattfinden kann als durch das vorangehende Einwirken des Trypsins (Carboxylpolypeptidase) und die darauffolgende Erepsinwirkung. Ob diese Deutung richtig ist, soll künftig weiter experimentell untersucht werden.

Die Versuche mit dem Casein und der Gelatine gelangen, wie aus der obigen Tabelle ersichtlich, im grossen und ganzen zu denselben Ergebnissen wie die mit dem Edestin.

Nun habe ich oben die durch die Arginase-Ureasemethode ermittelte Argininmenge ohne weiteres auf das freie Arginin bezogen. Ob diese Annahme tatsächlich zutrifft, muss zunächst geprüft werden. Es handelt sich dabei um zwei Fragen. Die erste Frage ist, ob die Arginaselösung unter der vorliegenden Versuchsbedingung ausschliesslich das Arginin angreift, das sich in frei losgelöster Form befindet, aber nicht das, welches mit anderen Aminosäuren irgendwie gebunden ist. Die zweite Frage ist, ob dasjenige Arginin, das mittels der Arginase zu bestimmen ist, auch nach der Flaviansäuremethode im gleichen Betrag ermittelt werden kann.

Die Spezifität der Arginase ist sehr streng. Irgendeine Änderung an der Guanidingruppe oder der Carboxylgruppe des Arginins verursacht seine Unspaltbarkeit durch die Arginase. Auch α -Methylarginin wird nicht und racemisches Arginin nur zur Hälfte und zwar an der *d*-Form gespalten. Daher scheint es, dass unter verschiedenen Derivaten des Arginins oder überhaupt des Guandin nur *d*-Arginin als ein einziges spezifisches Substrat der Arginase anzusehen ist. Eine Ausnahme macht jedoch α -Monobenzoylarginin, das nach Felix, Müller und Dirr (1928) durch Arginase hydrolysierbar sein soll. Diese Angabe ist sehr wichtig, weil es mit der Frage des vorliegenden Experiments innig zusammenhängt, ob das aminoacylierte Arginin oder überhaupt die argininhaltigen Polypeptide durch die Arginase den Harnstoff

liefern. Meiner Ansicht nach ist aber das Benzoylarginin wegen seiner Schwerlöslichkeit selbst bei neutraler Reaktion nicht geeignet für den Arginaseversuch. Daher habe ich das leicht wasserlösliche α -Monoacetylarginin nach Bergmann (1928) hergestellt und darauf die Arginase einwirken lassen. Harnstoffbildung wurde aber keineswegs beobachtet. Die gebrauchte Fermentlösung war der 50 fach verdünnte Glycerinextrakt. In solch verdünnter Arginaselösung kann man, wie oben erwähnt, die Wirkung der Protease nicht nachweisen und ausserdem auch nicht die Histozymwirkung. Daher kann angenommen werden, dass das bei vorliegendem Experiment mittels der Arginase-Ureasemethode bemessene Arginin nicht das gebundene Arginin einschliesst, und dass es sich dabei wirklich um die freie Aminosäure handelt.

Der zweite Beweis dafür muss damit geliefert werden, dass die fermentativ bemessene Argininmenge wirklich als Flavianat quantitativ fassbar ist. Daher habe ich mit der Gelatine den proteolytischen Versuch erneut angestellt. Nach 8 Tagen Pepsinwirkung wurde das Hydrolysat zur Hälfte geteilt, je bei Ph 8 durch Trypsin oder Erepsin weiter verdauen gelassen und nach 8 Tagen das losgelöste Arginin einerseits durch die Arginase-Ureasemethode und andererseits als Flavianat gravimetrisch bestimmt. Bei beiden Verdauungslösungen stimmten die auf zwei verschiedenen Weisen gemessenen Argininwerte gut überein. 10 ccm tryptischen Hydrolysats ergaben nach der Arginasemethode 0.0149 g Arginin (42.1% von Gesamtarginin) und bei der Flaviansäurefällung, als Arginin berechnet, 0.0149 g. 10 ccm ereptisches Hydrolysat, das durch den Zusatz der Erepsinlösung $\frac{4}{3}$ fach verdünnter als das tryptische Hydrolysat ist, lieferten 0.0148 g (56% von Gesamtarginin) sowohl nach der Arginase- als auch nach der Flavianatmethode. Ich möchte hier erwähnen, dass bei der Argininbestimmung durch das Flaviansäureverfahren das Verdauungsgemisch vorher mit Tierkohle zu behandeln ist, sonst wird das Arginin mit hochmolekularen Eiweisspaltprodukten mitgefällt und beim Umkristallisieren geht das Argininflavianat grösstenteils verloren und ausserdem ist selbst das extra zugesetzte Arginin nicht wieder gänzlich zu erhalten. Damit wird endlich festgestellt,

dass unter den proteolytischen Abbauprodukten die Substanz, aus der durch die Arginase der Harnstoff abzuspalten ist, nichts anderes als das freie Arginin ist.

Die Argininbestimmung mittels Flaviansäure habe ich auch an dem peptisch-ereptischen Caseinhydrolysat ausgeführt und die 100%ige Argininabspaltung, die, wie aus der oben angegebenen Tabelle ersichtlich, mittels der Arginasemethode ermessen wurde, konnte wieder gravimetrisch bewiesen werden. Dieses Ergebnis ist sehr wichtig, weil es eindeutig zeigt, dass das Gesamtarginin des Caseins durch die der peptischen Verdauung anschliessende Erepsinwirkung losgelöst wird, während beim Einkeilen der Trypsinwirkung, nämlich bei der Fermentwirkung in solcher Reihenfolge wie Pepsin, Trypsin und dann Erepsin, nur $\frac{2}{3}$ des Gesamtarginins als freie Aminosäure abgespalten wird, obwohl bei letzterem Fall die Hydrolyse hinsichtlich der Peptidkettenablösung im höheren Grad fortgeschritten ist.

Experimenteller Teil.

Das ganze Experiment hindurch ist die Versuchstemperatur der Fermentwirkung 37° . Ph elektrometrisch.

Das Ureasepräparat ist das früher in hiesigem Institut nach Van Slyke (1914) aus Jackbohnen hergestellte Pulver, leicht löslich in Wasser und seine Wirkung ist stark genug, um es im vorliegenden Experiment für die Argininbestimmung brauchen zu können. Im Versuchsansatz von 5 ccm $M/20$ Harnstofflösung + 4 ccm $M/10$ Phosphatpuffer (Ph 7) + 4 ccm 2% Ureaselösung wird die totale Hydrolyse in 1 Stunde beendet. Bei allen nachfolgenden Versuchen ist die Wirkungsdauer der Urease für die Bestimmung des abgespaltenen Arginins immer 1 Stunde. Die Ureaselösung ist bei jedem Versuch frisch zu bereiten. Das gebildete Ammoniak wird durch das 1 stündige Durchlüften des alkalisierten Ansatzes bei 50° in $N/10$ Schwefelsäure überdestilliert und acidimetrisch bestimmt.

Die Arginaselösung wird wie folgt hergestellt. Die frische Schweineleber wird zerhackt, gut gemahlen, mit 3 fachem Volumen 80%igen Glycerins gemischt, 1 Tag in den Eisschrank gestellt und

zentrifugiert. Der Extrakt kann im Eisschrank monatelang ohne merkliche Aktivitätsverminderung aufbewahrt werden.

Bei den Versuchen für die Argininbestimmung in den proteolytischen Hydrolysaten wird der Glycerinextrakt jedesmal frisch mit Wasser 50 fach verdünnt. 5 ccm verdünnten Extrakts + 10 ccm Phosphatpuffer + 10 ccm 5% Casein, 10% Wittepepton, 7% peptischen Edestinhydrolysats oder $M/10$ Glycylasparagin zeigen bei Ph 8 und 37° in 24 Stunden keine nach Willstätter alkoholtitrimetrisch zu beweisende COOH-Zunahme. Nach dieser Beweisführung von der praktischen Proteasenabwesenheit in dem verdünnten Extrakt ist er erst als die Arginaselösung für den Versuch brauchbar. Bestimmung von Ph-Optimum wird folgendermassen ausgeführt. Versuchsansätze von 5 ccm $M/20$ Arginin + 10 ccm Puffer + 5 ccm 50 fach verdünnten Extrakts werden nach 2 Stunden durch Zusatz mit 5 ccm $M/2$ Essig angesäuert, 10 Minuten in siedendes Wasser eingetaucht und filtriert. Für die Harnstoffbestimmung werden 10 ccm des abgekühlten Filtrats mit N Natronlauge gegen Lackmus neutralisiert und mit 4 ccm Phosphatpuffer (Ph 7) + 4 ccm 2% Urease versetzt. Ph-Bestimmung bei den Arginaseversuchen wird an den in gleicherweise zusammengesetzten Ansätzen ausgeführt.

pH	4.8	6.6	7.7	8.7	8.9	9.7	9.9	12.2
Harnstoff- bildung %	9.2	60.6	69.8	72.8	75.0	76.6	69.8	6.0

Edestin und Casein von Merck. Gelatine von Fujisawa, Osaka. Die Bestimmung des gesamten Arginingehalts wird wie folgt ausgeführt. 10.0 g Eiweiss werden in 10 ccm 25% Schwefelsäure durch 24 stündiges Kochen hydrolysiert, das Hydrolysat mit gesättigtem Baryt gegen Kongo neutralisiert, Bariumsulfat dann abfiltriert und fünfmal je mit 200 ccm Wasser gewaschen. Das gesamte Filtrat wird eingedampft, ohne Verlust im Messkolben auf 100 ccm gefüllt und mittels aktivierter Kohle entfärbt. An 5 ccm der Lösung wird das Arginin nach Kossel als Flavianat gravimetrisch bestimmt. Die Resultate sind zusammen unten angegeben.

- I. Edestin: 1) 0.0787 g 2) 0.0781 g als Arginin, 15.68% in Durchschn.
 II. Casein: 1) 0.0186 g 2) 0.0185 g als Arginin, 3.71% in Durchschn.
 III. Gelatine: 1) 0.0399 g 2) 0.0395 g als Arginin, 7.94% in Durchschn.

Die proteolytischen Versuche werden im allgemeinen wie folgt angesetzt. 40.0 g Eiweiss werden mit Wasser dann mit $N/10$ Salzsäure versetzt, bis die erhaltene Lösung das Kongopapier schwach bläulich färbt. Man verdünnt die Lösung weiter mit Wasser auf 400 ccm (10%ige Eiweisslösung), versetzt mit 200 ccm $M/10$ Glykokoll-Salzsäure-Puffer (Ph 2) und löst dann darin 4 g Pepsin (Grübber) auf. Ph-Bestimmung an der Lösung ergibt bei dem Edestin 1.94, bei dem Casein 1.92 und bei der Gelatine 1.87. Nach 7–8 Tagen wird die letzte Messung der COOH -Zunahme und der Argininabspaltung an dem peptischen Hydrolysat ausgeführt und je 200 ccm Hydrolysat werden weiter der Trypsin- oder Erepsinverdauung überlassen. Beim ersteren Fall macht man die Lösung durch Zusatz von A (48–55) ccm N Natronlauge annähernd zu Ph 8 und versetzt dazu mit 100-A ccm $M/10$ Phosphatpuffer (Ph 8) und dann 1 g Trypsin (Merek). Das gesamte Volumen macht also 300 ccm. Elektrische Ph-Bestimmung ergibt bei dem Edestin 7.8, bei dem Casein 7.8 und bei der Galatine 7.7. Beim zweiten Fall werden zu dem ebenso mit Phosphatpuffer versetzten Hydrolysat (300 ccm) 10 ccm dialysierter Erepsinlösung zugefügt, die nach Rice (1915) zubereitet ist. Das gesamte Volumen macht daher bei diesem Fall 400 ccm. Die beiden Lösungen werden an 5 ccm davon sogleich nach Willstätter alkoholisch titriert und im Brutschrank von 37° stehen gelassen.

Das peptisch-tryptische Hydrolysat wird weiter durch Erepsin verdaut, indem man 150 ccm davon mit 50 ccm Erepsinlösung versetzt, wobei Ph der Lösung nicht merklich verschoben wird, und sofort an 5 ccm alkoholische Titration ausführt.

Die Carboxylzunahme wird bei jedem Versuch an 5 ccm Verdauungslösung ausgeführt. Um das Ergebnis klar ersichtlich zu machen, wurden in der oben angegebenen Tabelle die ermittelten

ccm-Zahlen von $N/10$ alkoholischer Kalilauge bei dem Pepsinversuch für 2.5 ccm und bei dem Trypsin für 3.75 ccm des respektiven Hydrolysats umgerechnet, weil solche Volumina der Hydrolysate und 5 ccm Erepsinhydrolysat einheitlich 1.67 ccm 10% Eiweisslösung entsprechen sollen. Wie oben ausführlich erwähnt, wird die endliche Carboxylzunahme bei dem Pepsin-Trypsin-Erepsinversuch als 100% vorausgesetzt und der proteatische Hydrolysengrad in % ausgerechnet.

Die Argininbestimmung in den peptischen Hydrolysaten wird folgendermassen ausgeführt. 10 ccm davon werden durch Zusatz mit 1.8 ccm N Natronlauge schwach alkalisch gemacht und dann 20 ccm $M/10$ Glykokoll-Natronpuffer (Ph 10), 10 ccm Arginase-lösung und ausserdem 5 ccm Toluol zugefügt. Azidität der Lösung schwankt zwischen Ph 9.3–9.4. Nach 24 stündiger Wirkung bei 37° wird die Arginase durch Ansäuern mit 2 ccm $M/2$ Essig, wobei das ganze Volumen 43.8 ccm wird, und dann durch Erhitzen 10 Minuten im siedenden Wasserbad inaktiviert. Koaguliertes Eiweiss wird abfiltriert und 10 ccm abgekühlten Filtrats werden mit N Natronlauge gegen Lackmus neutralisiert und mit 4 ccm $M/100$ Phosphatpuffer (Ph 7) und dann mit 4 ccm 2% Ureaselösung versetzt. Nach 1 Stunde bestimmt man das Ammoniak nach Folin wie üblich. Als Kontrolle wird das Ammoniak direkt an 10 ccm desselben Filtrats ohne Ureaseverfahren bestimmt. Man multipliziert die Differenz des Hauptversuchs und der Kontrolle mit 2.19 und bekommt die Ammoniakmenge in ccm $N/10$, die aus 5 ccm peptischen Hydrolysats mittels der Arginase-Urease-methode abzuspalten ist. In den oben zusammengestellten Tabellen habe ich diese Ammoniak-ccm-Zahl weiter halbiert und für 1.67 ccm 10% Eiweisslösung umgerechnet angegeben, um damit auch bei der Argininabspaltung die Übersicht von dem ganzen Verlauf der Versuche zu erleichtern.

Die Bestimmung des Arginins in den tryptischen oder ereptischen Hydrolysaten ist prinzipiell gleich wie oben, nur die Proteasenwirkung muss vor dem Arginaseeinwirken unterbrochen werden. Dafür werden 10 ccm des proteolytischen Hydrolysats mit 1.2 ccm $M/2$ Essig schwach angesäuert und im Siedebad erhitzt.

Dabei entsteht jedoch kein Eiweisskoagulat. Die gesamte abgekühlte Lösung wird mit 0.8 ccm N NaOH schwach alkalisch gemacht, 10 ccm der Lösung + 20 ccm $M/10$ Glykokoll-Natronpuffer (Ph 10) + 10 ccm verdünnter Arginaselösung werden nach 24 stündigem Stehenlassen bei 37° durch Zusatz von 2 ccm $M/2$ Essig wieder schwach angesäuert und erhitzt, um die Arginase zu inaktivieren. An der neutralisierten Lösung werden einerseits der abgespaltene Harnstoff, wie bei dem Pepsinversuch, durch die Ureasemethode und andererseits das präformierte Ammoniak als Kontrolle sofort gemessen und die ermittelte Ammoniakmenge für 5 ccm tryptischen oder ereptischen Hydrolysats und dann wieder für 1.67 ccm 10% Eiweisslösung umgerechnet.

Der aus dem gesamten Arginingehalt berechnete Prozentsatz des abgespalteten freien Arginins bei jedem Versuch ist auch aus der oben angegebenen Tabelle ersichtlich.

Um das fermentativ losgelöste Arginin als Flavianat zu isolieren, habe ich den Pepsinversuch mit der Gelatine ganz in gleicher Weise wie früher angestellt und am 8. Tage der Verdauung das Hydrolysat wieder wie in oben angegebener Weise der tryptischen oder ereptischen Verdauung überlassen. Am 8. Tage werden die bei den Hydrolysate mit aktivierter Kohle behandelt und 10 ccm entfärbter Lösung bei kongoneutraler Reaktion mit 5 ccm 5% Flaviansäure versetzt. Nach 2 Tagen wird der Niederschlag aus verdünnter Flaviansäurelösung umkristallisiert, getrocknet und gewogen. Ausserdem wird 0.01 g Arginin zu 10 ccm von beiden entfärbten Hydrolysaten zugesetzt und wie oben in das Flavianat übergeführt, um damit das Resultat der quantitativen Argininbestimmung zu sichern. Dass es sich um das reine Flavianat handelt, wird durch die Schmelzpunktbestimmung bestätigt. Ergebnisse sind schon oben erwähnt.

Das endliche peptisch-ereptische Hydrolysat des Caseins wird in gleicher Weise mit aktivierter Kohle behandelt und das freie Arginin als rein Flavianat isoliert und gewogen. Über dieses Resultat habe ich auch schon berichtet.

α -Monoacetylarginin wird nach Bergmann (1928) hergestellt. Die prismatischen Kristalle ergeben die folgende Analyse.

$C_9H_{10}N_4O_3$ (216.2): gefunden N 25.8%,
berechnet N 25.9%.

5 ccm *M*/2 Acetylarginin + 10 ccm Glykokoll-Natrium + 5 ccm verdünnter Arginaselösung; Ph ist 9.6. Nach 24 Stunden wird aber weder Harnstoffbildung noch Carboxylzunahme beobachtet.

LITERATUR.

- Abderhalden, E. u. Reinhold, B. (1905): Z. physiol. Chem., **46**, 159.
Abderhalden, E. u. Schwab, E. (1932): Z. physiol. Chem., **212**, 61.
Abderhalden, E. u. Voegthlin, C. (1907): Z. physiol. Chem., **53**, 315.
Bergmann, M. u. Zervas, L. (1928): Bioch. Z., **203**, 280.
Brown, A. J. u. Millar, E. Th. (1906): J. Chem. Soc., **89**, 145.
Dauphinee, J. A. u. Hunter, A. (1930): J. of Biol. Chem., **85**, 627.
Felix, K., Müller, H. u. Dirr, K. (1928): Z. physiol. Chem., **178**, 192.
Ishiyama, T. (1933): J. of Biochem., **17**, 285.
Matsui, J. (1933): J. of Biochem., **13**, 163 u. 253.
Plimmer, B. H. A. u. Eaves, E. C. (1913): Biochemie. J., **7**, 297.
Ragins, I. K. (1928): J. of Biol. Chem., **80**, 551.
Shibata, K. (1934): Acta Phytochim., **8**, 173.
Torbet, V. u. Bradley, H. C. (1932): J. of Biol. Chem., **94**, cx.

EFFECTS OF ANTICOAGULANTS ON THE pH OF THE BLOOD.

(Studies on the blood pH estimated by the glass electrode method. II)

By

HISATO YOSHIMURA

(From the First Division of the Institute of Physiology, Kyoto Imperial University. Director: Prof. Dr. R. Shoji.)

(Received for publication, February 16, 1935)

INTRODUCTION.

In order to prevent blood coagulation, anticoagulants such as K-oxalate, Na-citrate, NaF, hirudin and heparin are generally used. Some of these have already been investigated with regard to their influence upon the blood pH.

It is supposed that K-oxalate can influence the blood pH by its own buffering action, owing to its basic property. As the commercial samples of these salts contain certain impurities, errors due to these impurities are to be expected. Peters and Van Slyke (1932) recommended that the pH of the oxalate solution should be brought to the blood pH; i.e. 7.4, by adding either acid or alkali, for it contains a little carbonate as impurity. Moreover, they drew attention to the affection of the corpuscular membranes by these anticoagulants. Eisenmann (1927) found that a shift of cell components and a change of the carbon dioxide tension of the blood were brought about by the addition of K-oxalate even in 0.2% concentration. On the other hand, Cullen (1922) stated that the addition of neutral K-oxalate in up to 1% concentration to defibrinated blood or to separated plasma or serum does not affect the pH of these samples. Similar results were obtained by Hirota (1925). As to hirudin, many investigators, namely Michaelis and Davidoff (1912), Menten (1920), etc., considered that it may be added in very considerable quantities to

the blood without any apparent influence on its pH.

In our previous report (1935), we pointed out that an acid change, measured by the glass electrode method, occurs in the blood shortly after it is shed at 37°C, regardless of whether any anticoagulant (except NaF) be added or not, and that the pH value of the whole blood estimated depends on the time after it has been shed. Observations previously reported on the influence of anticoagulants on the blood pH were all taken with little knowledge of the acid change, so that they require to be carefully reinvestigated, taking this change into consideration.

The aim of the present study is to examine the influence of generally used anticoagulants on the blood pH by the glass electrode method, before the blood has suffered an appreciable acid change, and to determine the one which is most suitable for studying the pH of the blood, especially that of circulating blood unaffected by the acid change already mentioned.

METHODS.

Use was chiefly made of the arterial blood of rabbits collected from a cannula inserted into one of the carotid arteries, in the manner described in the previous report (1935).

To examine the influence of anticoagulants upon the blood pH, the following procedure was adopted. The blood was collected, once in a syringe containing a certain amount of anticoagulant solution, and again in another syringe without any anticoagulant. The two blood samples were both transferred into glass electrodes. The sample mixed with the anticoagulant was treated first, because some anticoagulants have a depressing action on the acid change which takes place in the blood after it has been shed.

To estimate directly the difference between the pH of these two samples, the two electrodes thus prepared were connected in series, being oppositely directed from each other, and the potential difference of the cell thus composed was measured by means of the method described in detail in our first report (1935).

Several readings of the potential were taken ca. 4-6 minutes after the first collection of the blood. It was found that, in most

cases, their difference was minute, and so they were averaged. In cases where the difference was remarkable, the earlier readings, which differed from one another within ca. 0.01 pH, were averaged.

All experiments with rabbit blood were carried out at 37°C. Horse blood also was studied, at 16°C and 37°C.

Experimental Results and Discussions.

A. SOME PRELIMINARY EXPERIMENTS ON THE EXPERIMENTAL METHODS.

I. On the procedure of setting the electrodes with blood samples.

In order to examine the effects of anticoagulants on the blood pH before an appreciable acid change takes place, we had to set one glass electrode with the blood with an anticoagulant, and another electrode with a sample of the same blood without any anticoagulant as soon as possible after the blood was shed. These two blood samples could, of course, be prepared from one and the same blood sample collected once in a syringe. In this procedure, however, blood coagulation, which tends to begin already in the syringe, makes it difficult to fill the second electrode (treated later) with blood. I, therefore, collected the blood from the artery each time and set each electrode successively.

In order to avoid having an acid change take place in the blood shed earlier while the other electrode is being filled, it seemed better to keep the former for the time at the temperature of the room. In doing so, however, the sample put in the electrode became reduced in volume on being cooled, and an air bubble was drawn into the electrode from its open end, and thus the circuit was cut off. Therefore it was necessary to immerse the electrode in the thermostat at 37°C, as soon as it was mounted with the sample. Thus the sample set earlier suffered a longer lapse of time in the thermostat than that set later. The lapse of time between the settings of the two electrodes being generally ca. 1.5 minutes and the commencement of the reading generally ca. 4 minutes after the first collection of the blood, the acid change

might have taken place in the sample set earlier, before the reading commenced, whereas it was not likely to occur in the sample set later. Therefore, as preliminary to the study of the influence of anticoagulants on the blood pH, we had to examine the pH difference of two samples without anticoagulant collected each time from one and the same animal to be mounted in each electrode successively.

The results obtained are shown in No. 1 of Table 1. The pH of the blood first shed is smaller, by 0.007 pH on an average of

TABLE I.

Figure given = (pH of blood of the first set) - (pH of blood of the second set)

No. of experiment	No. 1 (Blood collected twice successively)	No. 2 (Blood collected once)
1	+0.005 pH	-0.016 pH
2	-0.003	+0.003
3	+0.021	-0.054*
4	-0.010	-0.100*
5	+0.003	-0.036
6	-0.020	-0.020
7	-0.031	0.000
8	-0.018	
Mean value	-0.0066 ± 0.0042	-0.014 ± 0.0052
Probable error of a single observation	±0.012 pH	±0.012 pH

8 cases, than that of the blood shed later. This fact indicates that there was a tendency for an acid change to begin earlier in the first sample than in the second. But as the probable error is ± 0.004 pH, and is equal to 2/3 of the mean value of the pH difference, this difference of pH is uncertain, and can be considered to be within the scope of the experimental error. The probable error of a single observation is ± 0.012 pH. Such a fairly large error is unavoidable, because the whole procedure should be carried out in a restricted time in order as far as possible to avoid any

acid change, but such experimental procedure is not easy.

Similar experiments were carried out with two electrodes mounted successively with the blood collected once in a syringe. In this case, some experiments had to be given up, because the blood clotted before the setting of the electrode was completed. The results obtained in the successful experiments are given in No. 2 of Table 1. The mean value of the pH difference of the two blood samples is 0.014 pH and can be regarded as within the scope of experimental error, though it is larger than that given in No. 1 of the table. Fairly large pH differences, shown by an asterisk, are examples of data obtained in certain cases where a fairly long time was spent in setting up the second electrode, owing to the commencement of blood clotting. These data are excluded in calculating the mean value. These facts show that this manner of preparing the two blood samples from the blood collected in one syringe is not recommendable.

II. Effect of the dilution of the blood sample with a NaCl solution.

In order to collect the blood unmixed with air, the empty space of the syringe and needle must be filled with physiological NaCl solution. This amounted to ca. 0.07 cc, while ca. 2-3 cc. of the blood was usually drawn, so that the blood was mixed with the solution to the extent of 1/30-1/40 of its volume. Owing to the sufficiently high buffer capacity of the blood, it is certain that the blood pH is not affected by such a small amount of salt solution. In cases where an anticoagulant solution is to be added to the blood, it is convenient to prefer the amount of the anticoagulant solution to one tenth of the total volume. In doing so, however, it is necessary to determine whether or not the blood pH is influenced by dilution of the blood to this extent. In order to test this, two electrodes were prepared with the same rabbit blood. The first one was filled with blood mixed with NaCl solution of only 1/30-1/40 of its volume, as mentioned above, while, in the second one, the same blood with 1/10 volume of the same NaCl solution was mounted. Then the potential of the cell set up with

these two electrodes was measured at 37°C, from which potential the pH difference of these two blood samples was computed, the time relation being the same as before.

The results obtained are given in Table 2. They show that the pH of the blood in the second electrode is greater by 0.005 pH on an average of 5 cases than that of the blood in the first elec-

TABLE II.
Effect of dilution of the blood sample with a physiological NaCl solution.

Figure given = (pH of blood of the first set) - (pH of blood of the second set with 1/10 volume NaCl solution)

-0.007 pH

-0.010

+0.011

-0.011

-0.010

Mean -0.0054±0.0028

trode. This difference is almost the same as that given in Table 1, which suggests that this pH difference is due rather to the fact that the acid change began earlier in the first electrode than to the addition of the NaCl solution. That is, if the acid change did not occur, the pH of the two blood samples would be the same. From these results, it can be concluded that the pH of the blood suffers no change when the blood is diluted by the addition of salt solution of one tenth of its volume or less. Accordingly, in the following experiments, in which the influence of anticoagulants on the blood pH was examined, anticoagulant solutions of various concentrations were added in the proportion of 1:9 to the blood, and their pH was compared with that of blood to which a small amount of NaCl solution (sufficient to fill the empty space of the syringe and needle) had been added.

B. COMPARISON BETWEEN THE pH OF BLOOD WITH ANTICOAGULANT SOLUTION AND THAT OF WITHOUT IT.

1. *The maximum concentration of anticoagulant having no influence on the pH of the blood.*

Oxalate, citrate, fluoride, a mixture of fluoride and oxalate,

hirudin and heparin were examined in respect of their influence upon the pH of rabbit blood, determined ca. 4–6 minutes after it was shed. Hirudin and heparin were dissolved in physiological NaCl solution. Each anticoagulant solution was added to the blood in the proportion of 1:9. The concentrations of the solutions used, and the results obtained are given in Table 3. From the results of the preliminary experiments (A), it is held that the

TABLE III.

Influence of addition of anticoagulant on the blood pH.

Effect of anticoagulant = (pH of blood with anticoagulant) – (that without it)

Anticoagulant	Conc. of the solution to be added (%)	Nos. of exps.	Effect of anticoagulant (on an average)
K-oxalate	2	2	–0.001 pH
	5	3	–0.010
	10	5	+0.039
Na-citrate	3.5	2	–0.012
	5	2	–0.021
	10	2	–0.088
NaF	1	3	–0.015
	2	6	–0.100
	3	1	–0.154
NaF + K-oxalate	0.5 + 1.5	3	+0.016
	1 + 1	2	–0.008
	2 + 1	5	–0.005
	3 + 1	2	–0.157
Hirudin	0.05	2	–0.003
	0.5	2	–0.014
Heparin	0.5	2	–0.005
	1	2	–0.005

pH difference of ca. 0.01–0.02 on an average of a few cases is within the scope of experimental error. Bearing this fact in mind, the approximate maximum concentrations of anticoagulants which

have no influence on the blood pH were selected from Table 3, and are given in the second column of Table 5 given below. The concentrations given in this table are of those contained in the blood, and not those of anticoagulant solutions themselves. With regard to hirudin and heparin, we did not examine with any higher concentrations than those given in the table, so that the figures given do not represent the maximum concentrations.

On the other hand, the approximate minimum doses of anticoagulants sufficient to prevent blood coagulation were studied. As soon as the blood was drawn from the carotid artery, an anticoagulant solution was added in the same proportion as above. The mixture was placed in a paraffinized tube and kept in a thermostat at 37°C for 2 hours to be examined for clotting. The results are given in Table 4. In this table, the sign '+' indicates that either clots were found or that the surface of the blood did

TABLE IV.
Prevention of blood coagulation by anticoagulant.

Anticoagulant	Concent. of the solution (%)	Clotting
K-oxalate	1	+
	2	—
Na-citrate	3	+
	3.6	—
NaF	1	+
	2	—
NaF K-oxalate	(0.5 1.5)	—
	(1 1)	—
Hirudin	0.05	±
	0.25	—
Heparin	0.1	+
	0.5	—

not move on canting the tube. '±' indicates that the glass rod with which the blood was scooped up drew out viscous threads. When these phenomena were lacking, the indication '—' is given. The concentrations of the anticoagulant solutions used are also given in the table. From the results obtained, the minimum concentrations of the anticoagulants in the blood for the prevention of coagulation are determined and given in the third column of Table 5. As for the mixture of NaF and K-oxalate, we did not examine it in concentrations below that given in Table 4 and 5.

Comparing these two columns of Table 5 with each other, we see that the former is greater than the latter except in the case

TABLE V.

Anticoagulant	Maximum concent. in blood causing no change of pH (%)	Minimum concent. in blood to prevent coagulation (%)
K-oxalate	0.5	0.2
Na-citrate	0.5	0.36
NaF	0.1	0.2
NaF + K-oxalate	0.2 + 0.1	0.1 + 0.1
Hirudin	0.05	0.025
Heparin	0.1	0.05

of NaF. In other words, anticoagulants with the exception of NaF have no influence on the pH of the blood in their minimum concentrations for preventing coagulation. NaF makes the blood reaction more acid by 0.10 pH on an average in 0.2% concentration in the blood, which is the minimum dose for preventing coagulation.

Similar results were obtained with horse blood. The first reading of the measurement, however, could be done at ca. 5–15 minutes after shedding, and the pH of the two blood samples, respectively with and without anticoagulant, was measured separately in each case in this experiment, the interval between the two measurements being ca. 5–10 minutes. Thus the experimental error is likely to be greater than that of the experiment

with rabbit blood described above. The results obtained are given in Table 6. They show that the blood pH is not changed by adding a 2.3% K-oxalate solution or a 3.6% Na-citrate solution in the

TABLE VI.

Horse blood			
Anticoagulant solution	Temp. (°C)	pH of blood without anticoagulant	pH of blood with anticoagulant
2.3% K-oxalate	16	7.699	7.715
	37	7.340	7.356
3.6% Na-citrate	16	7.694	7.678
	37	7.310	7.304

proportion of 1:9 to the blood. The coagulation of the blood was prevented completely, so that K-oxalate and Na-citrate have, in the case of horse blood also, no influence on the blood pH at their minimum concentration for preventing coagulation.

II. Changes in the blood pH by the addition of anticoagulants over the maximum concentration having no influence on the blood pH.

NaF:—As has been already related, the pH of the blood decreased markedly when a 2% NaF solution was added to blood in the proportion of 1:9. This change became greater when the concentration of the NaF was increased (cf. Table 3). In our previous report, we pointed out the acid change due to the affection of the corpuscular membranes by NaF. This is supposed to play an important part in the acid change here observed.

K-oxalate:—As is shown in Table 3, when K-oxalate (Merck, extra-pure) was added to blood in a concentration of 1%, its pH became more alkaline by 0.04 pH on an average. On the other hand, the pH of the 1% K-oxalate solution, as measured by means of the glass electrode at 37°C, was 6.88; that is, its pH was almost neutral. The arterial blood of rabbit was found in 13 cases to exist between pH 7.17–7.46. From this fact, it is certain that the alkaline change of the blood reaction on the addition of K-oxalate

was due, not to the buffer action of this salt, but probably to a change in the blood itself. When 2% NaF solution containing 1% K-oxalate was added to the blood, the acid change which is caused by NaF was eliminated by K-oxalate. That is, K-oxalate acts antagonistically against NaF on the blood pH, so that 1% K-oxalate counterbalances 2% NaF. When the NaF solution to be added to the blood was 3% in strength, its action surpassed that of the 1% K-oxalate solution, and the reaction of the blood became markedly acid, as can be seen from Table 3.

Na-citrate:—When Na-citrate (Merck, neutral) was added to blood in a concentration of 1%, the blood pH decreased by 0.09 on an average. The pH of 1% Na-citrate solution was found to be 7.62 at 37°C. Therefore the acid change of the blood reaction on the addition of Na-citrate is due, not to the buffer action of this salt, but probably to a change in the blood itself.

The fact that the effect of Na-citrate on the blood pH is greater than that of K-oxalate, which has been generally recognized, was also confirmed by our experiment. That is, the concentrations in the blood being both 1%, K-oxalate changed the blood pH by 0.04 on an average, while Na-citrate changed it by 0.09.

C. CHOICE OF ANTICOGULATION FOR STUDYING THE pH OF CIRCULATING BLOOD, AND A METHOD OF MEASURING ITS pH BY MEANS OF THE HYDROGEN GAS ELECTRODE.

We pointed out already in the first report that the blood suffers an acid change due to glycolysis after being shed and that therefore its pH depends on the time after shedding. Thus the pH of blood immediately after shedding, which we expect to be the same as that of its circulating state, can be determined only by means of the glass electrode method, because the pH value estimated by the hydrogen gas electrode method involves an error due to this change, as the equilibrium of its potential is attained only after a certain lapse of time. This fact can be confirmed by the experiment described below.

We investigated in our first report the influence of anticoagulants on the acid change, and in the previous part of the

present report we studied also their influence on the blood pH. On the basis of these results, it is now desirable to choose the most suitable anticoagulant for studying the blood pH, and on applying it, to find a method which will enable us to determine the pH of blood unaffected by the acid change with a hydrogen gas electrode.

In our first report, we saw that NaF and K-oxalate depress the acid change in shed blood, while the other anticoagulants, such as citrate, hirudin and heparin have little or no such action. But NaF decreases the blood pH markedly even in a concentration of 0.2%, which is the minimum concentration for preventing blood from coagulation. In the previous part of the present report, it was found that K-oxalate acts antagonistically against NaF on the blood pH, and when added in 0.1% concentration to blood, it depresses the effect of 0.2% NaF. The effects of the anticoagulants observed in that case, however, were only those for several minutes after shedding. Though there appeared no effect of NaF in such a short time, it might later cause an acid change due to its action on the corpuscular membranes, which was related in the first report. For example, on NaF being added to a blood in 0.05% concentration and K-oxalate in 0.15% being added at the same time, the blood reaction did not show any appreciable change for several minutes after shedding (cf. Table 3), though, in the experiment represented by b_1 in Fig. 5 in our first report, a remarkable acid change was observed after half an hour or more. From the above facts, it is clear that NaF is not a good anticoagulant for studying the blood pH, because of its action on the corpuscular membranes, and that the K-oxalate is the best.

Though the depressing action of K-oxalate in regard to the acid change is not so complete as that of NaF at 37°C, it can stop it, in a concentration of 0.2% in the blood, for many hours at 16°C or below, as is already pointed out in the first report. Thus, by adding K-oxalate to a blood sample as an anticoagulant, and keeping it at a low temperature, we can preserve the blood for many hours without any notable change in its pH.

Next, the concentration of K-oxalate solution for this purpose

will be studied. In the previous section of this report, attention was drawn to the fact that K-oxalate solution of 5% or below, on being added to blood in the proportion of 1:9, has no perceptible influence on the blood pH, at least for several minutes. The 5% solution is, however, hypertonic, and may affect the corpuscular membranes, causing shifts of the cell components. In fact, the blood mixed with anisotonic solution is apt to be hemolysed. Hiraki (1932) reported that 2.3% K-oxalate solution is isotonic for horse blood. Therefore, in order to exclude such apprehensions, the concentration of K-oxalate solution to be used should be ca. 2% and should be added to the blood in the proportion of 1:9.

Next, a method of measuring the blood pH by means of a hydrogen gas electrode will be studied. As to the oxalated blood at a low temperature, its pH can be determined by means of a hydrogen gas electrode, as in this case glycolysis is stopped. This fact was confirmed by using oxalated horse blood at 16°C, as is shown by Table 7. The pH value of whole blood obtained by means of the hydrogen gas electrode agreed well with that estimated with the glass electrode directly after the blood was drawn.

TABLE VII.
pH of the same oxalated blood at 16°C (horse).

Sample	Hydrogen gas electrode	Glass electrode
1	7.687 pH	7.692 pH
2	7.685	7.686

On the other hand, at 37°C, we could not determine accurately the pH of the whole blood by means of the hydrogen gas electrode, owing to the acid change due to glycolysis. An extreme example is given in Table 8, where the pH value of oxalated rabbit blood estimated with the hydrogen gas electrode is much smaller than that of the same blood determined with the glass electrode, immediately after shedding, without anticoagulant. The difference between them is 0.24 pH on an average, when the former was determined 31½ hours after shedding. In the case of two of the

TABLE VIII.
pH of the same blood at 37°C (rabbit).

No. of of electrode	Time after shedding	Hydrogen gas electrode			Glass electrode
		2°30'	3°	3°30'	immediately
1		7.205 pH	7.187 pH	7.174 pH	7.389 pH
2		7.153	7.163	7.150	
3		7.162	7.133	7.123	
Mean		7.173	7.161	7.149	7.389

three hydrogen gas electrodes used (No. 1 and No. 3 in the table), the pH of the blood decreased gradually, and the constant potential could not be attained, though, in No. 2, an apparent constancy was reached.

The fact that an accurate pH determination of whole blood is impossible by the hydrogen gas electrode method, is true not only for blood immediately after shedding, but also for all sorts of whole blood, when measured at 37°C, at which glycolysis proceeds rather rapidly.

As is well known, glycolysis is caused by the action of a glycolytic enzyme contained in the corpuscles, especially in the leucocytes. Accordingly, it never occurs in plasma perfectly separated from the corpuscular elements. Next, there is no doubt that whole blood has the same pH as its plasma, when estimated by the ordinary method. In fact, Parsons (1917) found that the pH of whole blood agreed well with that of its plasma, when the estimation was made with the hydrogen gas electrode. We confirmed the fact by means of the glass electrode method with oxalated horse blood at 16°C. As is seen in Table 9, the pH of the whole blood and that of its plasma coincided well with each other. From these facts, it is certain that the pH of the blood at body temperature can be obtained by estimating the pH of its plasma by means of the hydrogen gas electrode method at the same temperature. This fact was confirmed in the experiments described below.

TABLE IX.
Oxalated horse blood at 16°C.

No. of electrode	Plasma	Whole blood
1	7.656 pH	7.661 pH
2	7.689	7.686
3	7.679	
Mean	7.675	7.674

Now we shall discuss the procedure of preparing plasma samples. When we want to estimate the pH of circulating blood, it is best to separate the plasma completely from the blood at 0°C immediately after shedding, as the action of the glycolytic enzyme is inhibited by cold. When citrate, hirudin or heparin is used to prevent blood coagulation, the separation of the plasma must be carried out at 0°C. On using K-oxalate, however, it does not seem necessary to have this temperature. It was found that when the plasma is separated at the temperature of the room (24°C or below) within one hour, glycolysis is inhibited perfectly by K-oxalate, so that the pH of the plasma thus obtained will be the same as that of the circulating blood.

As soon as the blood was collected in a syringe from the carotid artery of a rabbit, part of it was transferred to a glass electrode and its pH was estimated at 37°C. To the remaining portion, 2% K-oxalate solution was added in the proportion of 1:9, and it was centrifuged at the room temperature (23°–24°C) at a speed of ca. 2500 revolutions per minute for ca. 30 minutes. (When the blood was centrifuged for ca. 10 minutes, the plasma obtained suffered a slow acid change, perhaps due to leucocytes remaining in it.) Then the plasma was separated from the blood one hour after shedding, and the pH of this plasma was estimated with a glass electrode and also with hydrogen gas electrodes. As given in Table 10, all three determinations agreed well with one another. Thus we could estimate the pH of the blood in its circulating state by means of the hydrogen gas electrode method.

TABLE X.
Rabbit blood at 37°C.

Anticoagulant solution	Sample	pH of blood immediately after shedding (with glass electrode)	pH of plasma (with glass electrode)	pH of plasma (with hydrogen gas electrode)
2% K-oxalate	1	7.423	7.416	7.413
	2	7.353	7.374	7.363
4% Na-citrate	3	7.415	7.356	7.363
	4	7.439	7.389	7.376

Similar experiments having been performed with a 4% Na-citrate solution, which is nearly isotonic, the plasma pH estimated was found to be smaller than that of the blood immediately after being shed. See the same table. This acid change was probably due to glycolysis, which proceeded before the plasma was separated, for citrate is not able to inhibit glycolysis perfectly. In other words, citrate is not a suitable anticoagulant for this purpose. It is certain that the same can be said of hirudin and heparin.

In short, according to our researches, oxalate is the most suitable anticoagulant for studying the blood pH. By adding ca. 2% oxalate solution to blood immediately after being shed in the proportion of 1:9, the plasma is separated completely from the corpuscles, especially from the leucocytes, within one hour at the room temperature (24°C or below). The pH of this plasma measured by the usual hydrogen gas electrode method gives the accurate figure for the blood in its circulating state. This method should be adopted not only for the estimation of the pH of circulating blood, but also generally for blood pH determinations at 37°C, in cases where the hydrogen gas electrode is employed.

RÉSUMÉ.

1. The influence of various anticoagulants on the blood pH having been studied within several minutes after shedding, it is found that they have no perceptible effect when solutions in the

following concentration or under are added to the blood in the proportion of 1:9.

K-oxalate:5%, Na-citrate:5%, NaF:1%, NaF 2% + K-oxalate 1%, hirudin:0.5%, heparin:1%.

These doses are all greater than minimum doses for preventing blood coagulation, except that of NaF.

2. When 10% K-oxalate solution is added to blood in the proportion of 1:9, the reaction of the blood shifts markedly towards the alkaline side. When a 2% or more concentrated solution of NaF, a mixture of 3% NaF and 1% K-oxalate, or a 10% Na-citrate solution are used in the same proportion as above, the blood suffers a remarkable acid change.

3. Among anticoagulants, K-oxalate is the most suitable one for studying the blood pH, as it inhibits, though not perfectly, the acid change due to glycolysis, while its influence on the blood pH is minute as compared with its action of preventing blood coagulation.

4. In order to estimate the pH of blood, especially that of blood immediately after shedding, at 37°C, by means of the hydrogen gas electrode method, the following procedure is recommended: Ca. 2% K-oxalate solution is added to the blood in the proportion of 1:9, and the plasma is separated perfectly from the corpuscles, especially from the leucocytes, at the room temperature (24°C or below) within one hour. The estimated pH of this plasma at the body temperature represents that of the blood, unaffected by glycolysis or any other disturbances.

REFERENCES.

- Cullen (1922): *J. Biol. Chem.*, **52**, 501.
 Eisenmann (1927): *Ditto*, **71**, 578.
 Hiraki (1932): *J. Biochem.*, **15**, 331.
 Hirota (1925): *Kyoto Igaku Zassi [Japanese]*, **22**, 1683.
 Menten (1920): *J. Biol. Chem.*, **43**, 383.
 Michaelis und Davidoff (1912): *Biochem. Z.*, **46**, 131.
 Parsons (1917): *J. Physiol.*, **51**, 440.
 Peters and Van Slyke (1932): *Quantitative Clinical Chemistry*, **2**, Chapter 2, Baltimore.
 Yoshimura (1935): *J. Biochem.*, **21**, 335.

DOES THE pH OF THE BLOOD CHANGE DURING CLOTTING?

Studies on the blood pH estimated by the glass electrode method. III

By

IIISATO YOSHIMURA.

(From the First Division of the Institute of Physiology, Kyoto Imperial University. Director: Prof. Dr. R. Shoji.)

(Received for publication, February 16, 1935)

INTRODUCTION.

At the present time, two views are held with regard to blood coagulation. One is the ferment theory originated by A. Schmidt (1861/62), and extended by Morawitz (1905) and others. The other is that which regards blood clotting as a physico-chemical reaction. Among advocates of the latter, Hekma (1913), Hirsh (1924) and also Stuber and Lang (1930) consider the acid change in shed blood as being an influential factor in the clotting process. For example, after estimating the lactic acid content of the blood before and after clotting, Stuber and Lang (1930) reported the existence of a parallel relation between the degree of clotting and that of glycolysis, and maintained that the acid change due to glycolysis brings the blood reaction to about the isoelectric point of fibrinogen, at which point the fibrinogen is precipitated in the form of insoluble fibrin. According to their theory, the blood reaction must shift to the acid side at least before the clotting begins.

There are several studies on this point. When he measured the pH of oxalated blood and of clotted blood by means of Dale-Evans' indicator method, Ross (1921) found no difference between the two. Kugelmass (1923) followed the pH changes in artificial coagulating systems; e.g. in mixtures of thrombin and

plasma or fibrinogen at various pH, by means of the hydrogen gas electrode method, and found that an alkaline change of 0.14–0.64 pH took place on coagulation. He attributed it to the adsorption of hydrogen ion by the fibrinogen on changing into fibrin. Stuber and Lang confirmed his results, when investigating the pH changes in clotting blood by the quinhydrone electrode method (1926), and also in artificial coagulating systems by means of the hydrogen gas electrode (1927). They maintained that this alkaline change is due to the adsorption of hydrogen ion on fibroin after this has been produced, so that this fact bears no relation to their theory. On estimating the pH of the plasma before clotting and that of its serum after coagulation by means of a spectrophotometer, Hirsh (1924) found that the latter is more acid by 0.09 pH on an average than the former, and considered that the acid change accompanies blood clotting and acts as a favorable condition for it.

This problem has been studied by most investigators on the pH of the plasma and serum, or of artificial coagulating systems, but not on actual coagulating blood. Stuber and Lang (1926) followed the changes in the pH of clotting blood by means of the quinhydrone electrode. But, in the light of our present knowledge, it is certain that this method may result in a serious error when applied to the case of whole blood, as its potential changes with the lapse of time. Thus, Stuber and Lang's result may include the change of potential of the quinhydrone electrode because of a chemical reaction between the quinhydrone and certain components of the blood.

Recently, Havard and Kerridge (1929) made direct investigations on the pH changes in clotting blood by means of the glass electrode method, and reported that the clotting had no influence on the blood pH, which result contradicts the above mentioned studies.

In the present research on this problem investigations were carried out by means of the glass electrode, the potential of which responds immediately to changes in the pH and undergoes no disturbance from the process of clotting. The results obtained

enable us to criticise the theories mentioned above, especially Stuber and Lang's theory of clotting.

METHOD.

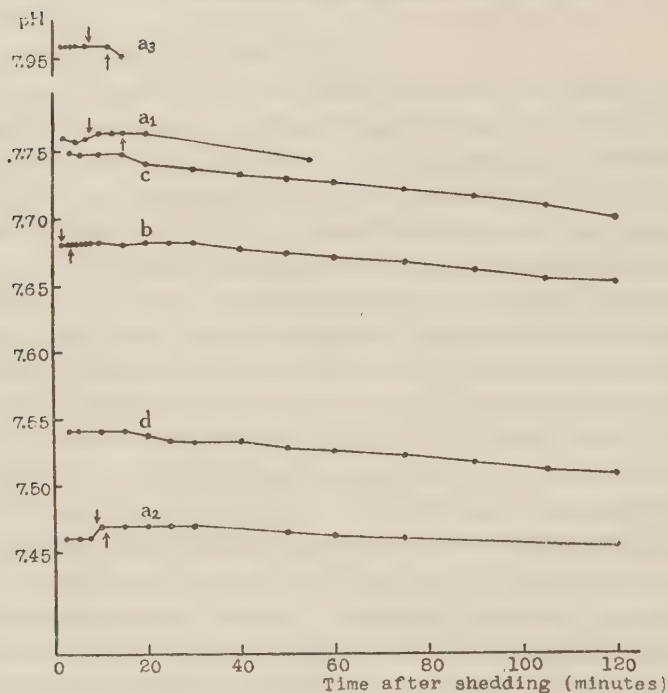
The samples used were rabbit and toad blood. At 37°C, the blood clotted so rapidly that the change in the pH during the coagulation could not be followed. Therefore, the process was studied at room temperature, usually at 16°C, when the clotting of the blood was to a certain extent delayed, this temperature being really the physiological one for toad blood.

As soon as the blood was collected in a syringe, it was transferred to a glass electrode, and the changes of its pH were followed over a space of time. The details of the method of measuring were the same as those already described in the first report of this study (Yoshimura, 1935). In order to determine the time point of the beginning and end of the blood clotting, a portion of the same blood was transferred into a capillary tube of ca. 1 mm bore and the flow of blood was observed, the tube being inclined every ten seconds or so. When the flow began to be delayed, or when a drop of blood kept between the finger-tips began to develop a viscous thread, it was taken as being the initial point of the clotting. When the blood in the capillary ceased to flow, it was taken as being the final point of the blood clotting. Thus, the changes of the pH and the progress of the blood clotting were observed simultaneously with blood samples from the same source, at the same temperature.

EXPERIMENTAL RESULTS.

In 18 experiments with toad blood, it was observed that the blood clotting began ca. 8–10 minutes and was completed ca. 5–15 minutes after the blood had been collected. No acid change could be found either before, or during, the course of the coagulation. In 14 of the cases, a slight alkaline change of 0.003–0.014 pH was found to begin almost simultaneously with the clotting. This can be seen in examples a_1 and a_2 of Fig. 1. In this figure, the beginning of the blood coagulation is marked ↓, the end ↑. In the

Fig. 1.
Blood clotting and blood pH.



a₁, a₂ & a₃. Toad blood

b. Rabbit blood

c. " 9 + (0.15% Hirudin) 1

d. " 3 + (4% Na-citrate) 1

other 4 cases, the blood pH remained constant (cf. a₃, Fig. 1). An acid change was found to begin first ca. 12-60 minutes after shedding. That this change is due to glycolysis was proved by the fact that it was stopped by the addition of NaF (cf. our first report).

In 4 experiments with rabbit blood, the clotting began ca. 1-2 minutes and ended ca. 3-5 minutes after shedding. The pH remained constant before, as well as during, the coagulation (cf. b, Fig. 1). The acid change due to glycolysis was found to begin first 15-60 minutes after shedding.

In short, the acid change due to glycolysis takes place neither before nor during the course of the blood coagulation, but begins after the coagulation is completed. A slight alkaline change was found in coagulating toad blood, as Kugelmass (1923) had already reported, but its extent was not so great as that found by him.

As shown by *c* and *d* in Fig. 1, blood in which clotting was completely prevented by the addition of an anticoagulant (hirudin or Na-citrate), also suffered an acid change. Similar results were obtained in the case of experiments at 37°C, as has already been related in the first report. In short, an acid change due to glycolysis occurs even when blood clotting is completely stopped by anticoagulants.

DISCUSSIONS.

From the results described above, it is certain that blood clotting takes place regardless of the acid change of the blood. This fact coincides with Havard and Kerridge's results. The alkaline change which we found in coagulating toad blood is probably due to the adsorption of hydrogen ion by the fibroin, as set out by Kugelmass (1923). It is supposed that adsorption of hydrogen ion takes place in the case of rabbit blood also, but as no alkaline change appears, probably the buffer capacity of rabbit blood is greater than that of toad blood. As is stated above, Stuber and Lang (1926/27) also confirmed an alkaline change, which they regarded as a secondary process after the blood clotting. By reason of the fact that the change estimated by the ordinary method of pH-determination represented the final result of the changes that have occurred in the complicated coagulating system, they did not regard the occurrence of alkalinity as evidence against their theory of blood clotting. It is difficult to understand why an acid shift of the pH of the medium (brought about by the acid production of glycolysis) to the isoelectric point of fibrinogen, at which point the fibrinogen precipitates itself, should not come out on the potential of the glass electrode membrane touching the medium. So long as any acid shift in the reaction of the medium

is not detected by the measurement of the potential, the coagulation of fibrinogen to form solid fibrin cannot be attributed to any acid change due to glycolysis.

Stuber and Lang (1930) thought that certain anticoagulants exert two actions in preventing coagulation, i.e. (1) they depress the glycolysis and further (2) render the colloidal state of plasma-protein stable. No definite evidence was, however, advanced by them to account for the presence of such stabilizing power. Contrary to the first point of their theory, we found that the acid change due to glycolysis took place in blood in which coagulation had been prevented by means of an anticoagulant. From the fact described above, it is certain that the acid change due to glycolysis has no direct relation to blood clotting, so that we cannot agree in this respect with Stuber and Lang, who regard the acid change due to glycolysis as the direct cause of blood clotting.

RÉSUMÉ.

There is no direct relation between blood clotting and the acid change of the blood reaction. The acid change does not occur during the course of blood clotting at 16°C. On the other hand, it takes place in blood which has been prevented from coagulating by the application of an anticoagulant. Therefore Stuber and Lang's view, who attributed the cause of blood coagulation to the acid change due to glycolysis, is invalid.

REFERENCES.

- Havard and Kerridge (1929): *Biochem. J.*, **23**, 600.
Hekma (1918): *Nederl. tijdschr. v. geneesk.*, **1**, 1386; *Chem. Abst.*, **13**, 37.
Hirsh (1924): *J. Biol. Chem.*, **61**, 795.
Kugelmass (1923): *Arch. internat. Physiol.*, **21**, 139.
Morawitz (1905): *Erg. Physiol.*, **4**, 307.
Ross (1921): *J. Physiol.*, **54**, 80.
Schmidt (1861, 62): *Arch. f. Anat. u. Physiol.*
Stuber u. Lang (1926): *Biochem. Z.*, **179**, 70.
Stuber u. Lang (1927): *Ditto*, **191**, 379.
Stuber u. Lang (1930): *Die Physiol. u. Pathol. d. Blutgerinnung*, Berlin u. Wien.
Yoshimura (1935): *J. Biochem.*, **21**, 335.

ON THE MECHANISM OF ANAEROBIC DECOMPOSITION OF HEXOSEPHOSPHORIC ACIDS BY ANIMAL TISSUES.

III. On Simple Hydrolysis of Hexosephosphoric Acids by Phosphatase.

By

TAKEHIKO TAKAHASHI.

(From the Department of Biochemistry, Niigata Medical College.
Director: Prof. N. Ariyama.)

(Received for publication, February 26, 1935)

When hexosediphosphoric acid is decomposed by the coenzyme-free, glycolytic enzyme system, there is produced, besides methylglyoxal, a small quantity of hexosemonophosphoric acid and of free hexose. This fact led Neuberg to the assumption that in the natural glycolytic process hexosediphosphoric acid might be disintegrated into C_3 -compounds through intermediary stages of hexosemonophosphoric acid and free hexose. On the basis of this hypothesis phosphatase has been assumed to be involved in the natural glycolysis or at least in the decomposition of hexosediphosphoric acid into methylglyoxal.

It is yet an unsettled problem whether the phosphatase which hydrolyzes glycerophosphoric acid is identical with the enzyme which liberates phosphoric acid from hexosediphosphoric acid when the latter substance is decomposed into methylglyoxal. Brain tissue is very active in producing methylglyoxal but it is low in phosphatase content; bone tissue does not produce methylglyoxal so actively for its phosphatase content.

To solve this problem the present writer has investigated the decomposition of diphosphoric ester into methylglyoxal by the enzyme systems obtained from animal tissues. He has found that monophosphoric ester and free sugar are actually produced from diphosphoric ester by the action of phosphatase, but that they are

the products of a side reaction which has no direct relation to the formation of methylglyoxal. Free sugar is to be regarded as the end-product of the simple hydrolysis of diphosphoric ester by phosphatase. Thus a suggestion has arisen that the production of methylglyoxal from diphosphoric ester might follow a process which differs from that in Neuberg's hypothesis.

EXPERIMENTAL.

In experiments of detecting methylglyoxal formed from hexosediphosphoric acid, it has been the custom to use, as the enzyme source, tissue extracts which are deprived of the co-enzyme of glyoxalase by autolysis or dialysis. The use of the enzyme in such non-physiological conditions is, however, unavoidable in order to check the reaction at the stage of methylglyoxal.

The enzyme solutions employed in the present experiments were the filtrates of autolyzed tissue-extracts of the rabbit. Autolysis was performed by incubating the tissue hashes with four times the weight of water at 37°C for 2 days in the presence of toluene.

The experimental conditions are stated briefly in the tables which correspond to the respective experiments.

Hexosemonophosphoric acid was determined by taking advantage of the difference in solubility of the calcium or barium salts of di- and monophosphoric esters. Free sugar was measured from the decrease of reducing power after fermentation of the solution which was freed from di- and monophosphoric esters by precipitating their Ca or Ba salts with alcohol. Phosphoric acid was determined by the usual colorimetric methods; lactic acid by the Friedemann, Cotonio and Shaffer method; methylglyoxal by the Ariyama or Barrenscheen method.

1. Hydrolysis of hexosediphosphoric acid into hexosemonophosphoric acid and free hexose by phosphatase.

The first experiments to be reported are concerned with the question whether the ordinary phosphatase would really take part in the initial stage of the decomposition of diphosphoric ester. It

was found that the tissues which contained more phosphatase were more active in producing monophosphoric ester and free hexose. As is shown in Table I, kidney and bone tissues which were rich in phosphatase, far exceeded in this respect, brain, liver and muscle tissues which were low in phosphatase content. The activity of phosphatase was examined in the usual way by determining the quantity of the phosphoric acid liberated from sodium glycerophosphate; the data in the table represent the amount of hydrolysis reckoned as mg. per-cent of phosphorus liberated. Under the experimental conditions the quantity of monophosphoric ester was far smaller than that of free hexose. This was especially the case when the experiments were prolonged for several days. The hexose liberated was exclusively glucose. The monophosphoric ester which was obtained by hydrolyzing diphosphoric acid with the autolyzed kidney tissue showed towards Hanes' reagents 80.0% reducing power of the equivalent amount of glucose, while towards hypiodite it was 50.8%. $[\alpha]_D^{21} = +21.7^\circ$ (free acid). These results indicated that monophosphoric acid consisted of 50% aldo-ester and 50% keto-ester. When the kidney tissue which was purified by the Erdtman method (see below) was used, the monophosphoric

TABLE I.
Production of Free Hexose from Hexosediphosphate and Hydrolysis of
Glycerophosphate by Various Tissues of Rabbit.

Tissue autolysate	15 cc.
Sodium hexosediphosphate or	1.0 gm.
Sodium glycerophosphate	
Carbonate-bicarbonate buffer (pH 8.9)	50 cc.
Aq. dest.	to 250 cc.
Toluene	5 cc.
37°C. 36 hours.	

Tissue	Hexose liberated from hexosediphosphate (mg. %)	Phosphorus liberated from glycerophosphate (mg. %)
Kidney	102.0	29.8
Bone	85.4	18.7
Liver	32.2	3.6
Brain	1.1	2.2
Muscle	0.6	1.0

ester isolated was the mixture of 25% aldo-ester and 75% keto-ester; the reducing power was 78.6% towards Hanes' reagents and 23.8% towards hypiodite, $[\alpha]_D^{20} = +12.4^\circ$ (free acid). Monophosphoric ester was isolated in the following way. To avoid the subsequent hydrolysis of the monophosphoric ester once formed, the hydrolysis of diphosphoric ester was carried out with a relatively small quantity of kidney-phosphatase at a hydrogen-ion concentration higher than the optimum value for phosphatase. 15 gm. of sodium hexosediphosphate were mixed with 50 cc. of the kidney-autolysate or with 10 cc. of the Erdtman extract and diluted to 250 cc. with water. Monophosphoric ester was isolated as Ba-salt after 40 hours' incubation at 37°C . in the presence of toluene. Neuberg and Leibowitz (1927) isolated the Robison ester from diphosphoric ester by hydrolyzing the latter substance with kidney-phosphatase. It seems to the present writer that the nature of the monophosphoric acid formed might vary according to the conditions of the experiment.

The line of experimentation followed was to separate phosphatase from other enzymes which included glycolytic enzyme. The Erdtman method (1927) of purifying phosphatase was found to be available for this purpose. Kidney- and bone-extracts treated with this method were still highly active in liberating phosphoric acid and hexose from diphosphoric ester (Table II). Attention is to be paid to the fact that methylglyoxal was never produced. Under certain conditions the yield of free sugar corresponded to more than 90% of the value calculated from the quantity of the phosphoric acid liberated (Table III). The experiments listed in Table II were carried out in the boric acid-borax buffer of pH 6.8, so as to prevent the subsequent disappearance of the methylglyoxal, if formed. However, since the presence of borate inhibits the activity of phosphatase and interferes with the determination of sugar, the experiments in which the yield of sugar was examined were performed in the carbonate-bicarbonate buffer of pH 8.9 which was the optimum hydrogen-ion concentration for the hydrolysis of diphosphoric ester by the purified enzyme. The rate of hydrolysis of the ester by the purified liver-autolysate was quite low, nor was

TABLE II.
Decomposition of Hexosediphosphate by Purified Enzyme of
Various Tissues.

Purified enzyme solution (Erdtman)	5 cc.
Sodium hexosediphosphate	500 mg.
Boric acid-borax buffer (pH 6.8)	50 cc.
Aq. dest.to	250 cc.
Toluene	5 cc.
37°C	

Tissue	Time of incubation (hr.)	Phosphorus liberated (mg. %)	Methylglyoxal formed	
			(mg. %)	%
Kidney	20	21.8	0	0
	48	27.3	±	0
Bone	20	17.5	0	0
	48	26.1	±	0
Liver	20	0.9	0	0
	48	1.5	±	0
Muscle	20	1.9	4.3	99.4
	48	4.9	11.0	98.2

there any production of methylglyoxal in this case. Muscle was an exception. The purified muscle-extract liberated phosphoric acid from the ester only to a slight degree, but it produced methylglyoxal at a high rate. This is explainable by the evidence that the muscle-extract was exceedingly rich in the enzyme which produces methylglyoxal from the ester and a part of it remained still active after the purification. Under these circumstances the most part of the phosphoric acid liberated was the result of the decomposition of the ester into methylglyoxal, since muscle tissue contains phosphatase only in a very small quantity.

The phenomena quoted above can be interpreted, if tried in the Neuberg fashion, as the sequence of the survival of phosphatase in the extracts and of the inactivation of "glycolase" which was postulated to decompose free sugar into methylglyoxal. However, the hexose which had been once produced was never decomposed into methylglyoxal under the experimental conditions.

TABLE III.
Production of Free Hexose from Hexosediphosphate by Purified
Kidney Phosphatase.

Purified kidney phosphatase	2.5 cc.
Sodium hexosediphosphate	500 mg.
Carbonate-bicarbonate buffer (pH 5.9)	50 cc.
Aq. dest.to	250 cc.
Toluene	5 cc.
37°C.	

Time of incubation (hrs.)	Phosphorus liberated (mg. %)	Hexose formed	
		(mg. %)	%
24	23.7	63.0	91.7
48	27.0	69.0	101.1

The replenishment of "glycolase" by adding to the purified extracts the tissue-autolysates was completely ineffectual in disintegrating the sugar molecule.

In connection with the stoppage of the production of methylglyoxal from diphosphoric ester by the purified enzyme, it may be added here that the purified enzyme lost the ability of converting the ester into triosemonophosphoric acid which was considered by Meyerhof and Lohmann (1934, i) as the precursor of methylglyoxal. The exceptional behaviour of the muscle tissue mentioned above might be due to the action of the survived "zymohexase." With the employment of the autolyzed tissue-extracts, Nakamura (1935) found that all the animal tissues were capable of decomposing hexosediphosphoric acid into triosephosphoric acid. It was pointed out during the present experiments that triose-ester was hydrolyzed by phosphatase at a higher velocity than hexosediphosphoric acid (Table IV). A good deal of triose-ester must have been hydrolyzed side by side with hexosediphosphoric acid in the present experiments in which the autolysates were used. This might be especially the case when the tissues rich in phosphatase were employed. In fact, it is demonstrated in Table V that the hydrolysis of triose-ester took place under the experimental conditions at pH 9, but only slightly at a pH lower than 7. The hydrolysis of triosephosphoric acid by phosphatase had no bearing

TABLE IV.

Hydrolysis of Hexosedi- and Triosemonophosphoric Acid by Phosphatase.

Sodium hexosediphosphate or	
Sodium triosemonophosphate	300 mg.
Purified kidney-phosphatase	3 cc.
Carbonate-bicarbonate buffer (pH 8.9)	20 cc.
Aq. dest.	to 100 cc.
Toluene	2 cc.
37° C.	

Control: triose-ester without enzyme.

	Time of incubation (hrs.)	Phosphorus liberated (mg. %)	Reducing substance produced (mg. %)*		
			Total sugar	Fermentable sugar	Non-fermentable sugar
Di-ester	2	12.32	16.53	12.71	3.82
	5	20.19	37.33	31.42	5.91
Triose-ester	2	19.21	66.33	9.12	56.21
	5	32.86	104.80	15.04	89.76
Control	2	4.88	3.20	0	3.63
	5	10.48	14.13	0.99	13.15

* The values are expressed in terms of glucose.

on the production of methylglyoxal; the triose once formed remained unchanged under any conditions.

All the facts seem to suggest that free hexose is the product of the simple hydrolysis of hexosediphosphoric acid by phosphatase and that it is not an intermediary product of the formation of methylglyoxal, so far as the autolyzed extracts are used.

The question was then raised whether hexosemonophosphoric acid would be the intermediary product of the simple hydrolysis of hexosediphosphoric acid. The interconversion between di- and monophosphoric esters has been observed repeatedly, but the true significance of the correlation of these esters one with another has never been settled.

Monophosphoric esters (the Neuberg, Embden and

TABLE V.
Hydrolysis of Triose-Ester.

Experiments:—

0.5 cc. purified kidney-phosphatase + 72.4 mg.

Na-triosephosphate + 50 cc. buffer solution.

No. 1 : pH 6.5 NaHCO_3 -HCl mixture.

No. 2 : pH 8.9 NaHCO_3 - Na_2CO_3 buffer.

No. 3 : pH 6.5 boric acid-borax buffer.

No. 4 : pH 8.9 boric acid-borax buffer.

No. 1'-No. 4': same to the corresponding main experiments,
but without the enzyme.

Mixtures were diluted to 100 cc. with water.

2 cc. toluene. 37°C.

Incubation No. of exper.	Phosphorus liberated (mg. %)						Methylglyoxal produced (mg. %)		
	Total amount			Amount due to phosphatase					
	6 hrs.	12 hrs.	24 hrs.	6 hrs.	12 hrs.	24 hrs.	6 hrs.	12 hrs.	24 hrs.
1	2.97	4.31	6.67	0.65	0.53	0.87	5.54	8.54	12.85
1'	2.32	3.78	5.80				5.13	7.62	12.15
2	7.67	9.12	10.10	4.02	3.92	2.27	0.99	0.44	±
2'	3.65	5.20	7.83				4.65	5.55	5.13
3	3.11	4.47	7.09	0.79	0.62	1.29	5.34	8.41	12.52
3'	2.32	3.85	5.80				5.13	7.83	12.71
4	6.35	7.89	9.12	3.38	3.58	2.68	4.72	6.13	7.00
4'	2.97	4.31	6.44				6.54	9.87	15.00

Robison esters) were hydrolyzed by the tissue-autolysates simply into phosphoric acid and free hexose; no methylglyoxal was formed (Table VI). The quantity of hexose corresponded to more than 90% of the value calculated from the amount of the phosphoric acid liberated (Table VII). There was no distinguishable difference in the velocity of hydrolysis between the three esters. As is shown in Table VI the hydrolysis was marked in tissues, such as kidney and bone, while it was of a slight degree in other tissues. The hydrolysis of monophosphoric ester by the autolysates took place far more slowly than diphosphoric ester. The free sugar once formed was never decomposed into methylglyoxal under the experimental conditions; the supplement of "glycolase" or the co-

Anaerobic Decomposition of Hexosephosphoric Acids.—III. 311

TABLE VI.

Decomposition of Neuberg's Ester by Autolysates of Various Tissues.

Tissue autolysates	5 cc.
Sodium hexosemonophosphate (Neuberg)	400 mg.
Boric acid-borax buffer (pH 6.2)	50 cc.
Aq. dest.to	250 cc.
Toluene	5 cc.
37° C.	

Tissue	Time of incubation (hrs.)	Phosphorus liberated (mg. %)	Methylglyoxal formed (mg. %)
Kidney	24	2.7	±
	48	3.3	±
Bone	24	4.2	±
	48	7.6	±
Liver	24	0.9	±
	48	1.8	±
Muscle	24	0.7	±
	48	0.8	±
Brain	24	0.4	±
	48	0.5	±

TABLE VII.

Production of Free Hexose from Neuberg's Ester by Bone-autolysate.

Bone-autolysate	5 cc.
Sodium hexosemonophosphate (Neuberg)	400 mg.
Carbonate-bicarbonate buffer (pH 8.9)	50 cc.
Aq. dest.to	250 cc.
Toluene	5 cc.
37° C.	

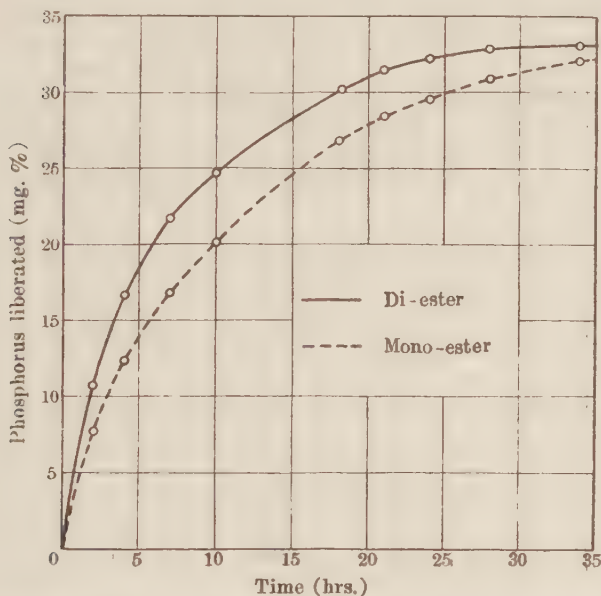
Time of incubation (hrs.)	Phosphorus liberated (mg. %)	Hexose formed	
		mg. %	%
25	14.31	76.8	92.6
48	14.76	80.8	94.4

enzyme of the glycolytic system failed. It was indicated by the above experiments that monophosphoric ester was simply hydrolysed to phosphoric acid and sugar by the tissue-autolysates while diphosphoric ester was further decomposed into methylglyoxal. That monophosphoric ester has no direct relationship to the methylglyoxal formation can be concluded also from the fact that the ester never produced triose-phosphoric acid. Meyerhof and Lohmann (1934, ii) wrote briefly that they observed similar phenomena under different conditions from those of the present experiments. Hexosemonophosphoric acid might probably be the intermediate of the simple hydrolysis of diphosphoric ester into free sugar. However, the hydrolysis of diphosphoric ester seemed to take place in a more complicated way than the simple liberation of two molecules of phosphoric acid in succession. The detailed examination on this point is now in progress. The fact that monophosphoric ester was formed only in a small quantity in the course of the hydrolysis of diphosphoric ester, may be explainable by the evidence that di- and monophosphoric esters were hydrolyzed by the purified enzyme at velocities which were not widely divergent; diphosphoric ester was hydrolyzed a little faster than the other (Fig. I).

Optimum hydrogen-ion concentration for the liberation of phosphoric acid from hexosemono- and diphosphoric acids was examined. It is shown in Table VIII that the hydrolysis of monophosphoric ester by the tissues took place most prominently at pH 9, while the rate of the liberation of phosphoric acid from diphosphoric ester varied with different tissues. Optimum hydrogen-ion concentrations lay at pH 9 for kidney, bone and liver tissues, but at pH 7 for muscle and brain tissues. The explanation for the variation of optimum hydrogen-ion concentrations with varying tissues and esters may be as follows. When it is considered that monophosphoric ester suffers only simple hydrolysis, it will be easily understood why monophosphoric ester splits off phosphoric acid most rapidly at the optimum hydrogen-ion concentration for phosphatase. The liberation of phosphoric acid takes place under more complicated circumstances in the case of

Fig. 1.
Liberation of Phosphoric Acid from Hexosedi- and Monophosphate
by Purified Kidney-Enzyme.

Purified kidney enzyme	2 cc.
Sodium hexosediphosphate	600 mg.
Sodium hexosemonophosphate (Neuberg)	853 mg.
Carbonate-bicarbonate buffer (pH 8.9)	50 cc.
Aq. dest.	to 250 cc.
Toluene	5 cc.
37°C.	



diphosphoric ester. There are two methods of liberating phosphoric acid. The one is the simple hydrolysis of the ester by phosphatase; the other is the decomposition of the ester into methylglyoxal. In kidney and bone tissues, phosphatase plays an important rôle for the liberation of phosphoric acid; in consequence the optimum hydrogen-ion concentration lies at pH 9. In muscle and brain tissues which are rather low in phosphatase content, phosphoric acid is liberated mainly as the result of the decomposition of the ester into methylglyoxal and this reaction was found to be carried out most notably at pH 7. Liver occupies the inter-

TABLE VIII.

Influence of Hydrogen-Ion Concentration on Liberation of Phosphoric Acid from Hexosedi- and -Monophosphate by Various Tissue-Autolysates.

Tissue-autolysate	5 cc.
Sodium hexosediphosphate	500 mg.
Sodium hexosemonophosphate (Neuberg)	400 mg.
CO ₂ -NaHCO ₃ or NaHCO ₃ -Na ₂ CO ₃ buffer	50 cc.
Aq. dest.to	250 cc.
Toluene	5 cc.
37°C.	

Tissue	Time of incubation (hrs.)	Phosphorus liberated (mg. %)							
		Mono-ester				Di-ester			
		pH 6.2	pH 7.0	pH 8.9	pH 9.6	pH 6.2	pH 7.0	pH 8.9	pH 9.6
Kidney	24	2.7	3.0	9.8	9.1	10.6	11.0	15.4	13.5
	48	3.3	4.3	13.7	13.1	17.3	17.8	18.2	15.4
Bone	24	4.2	6.5	12.3	8.7	7.6	8.7	17.0	16.0
	48	7.6	10.7	16.7	9.5	13.2	13.7	18.5	17.9
Liver	24	0.9	1.3	5.0	4.9	8.2	9.4	11.2	7.3
	48	1.8	2.0	7.1	6.8	15.1	16.0	13.7	7.7
Muscle	24	0.4	0.4	0.8	0.7	11.2	12.7	11.2	4.1
	48	0.7	0.6	0.9	0.8	16.8	17.7	12.8	4.3
Brain	24	0.4	—	0.6	—	11.0	12.0	11.5	6.7
	48	0.5	—	0.8	—	17.1	17.6	13.2	7.1

mediary situation between kidney and muscle groups in every respect. It contained more phosphatase than the latter group but less than the former. Its optimum hydrogen-ion concentration for liberating phosphoric acid from the ester was at pH 9, but the rate of the increase in the activity of phosphatase by changing the hydrogen-ion concentration from pH 7 to 9 was not so marked as in the kidney group.

It will be noticed in Table VIII that the optimum pH value for dephosphorylation of the di-ester by liver was observed to have changed from pH 9 to pH 7 after 48 hours. This apparently

inconsistent evidence may be explainable in the following way. As was pointed out by Meyerhof and Lohmann (1934, ii), the production of triose-ester was not influenced by the pH values of the medium. However, this was observable only for several hours at the initial stage of the reaction; later the production of the ester became slower at higher alkalinity (Table IX). This was

TABLE IX.

Production of Triosephosphoric Acid from Hexosediphosphate at Various H-Ion Concentrations.

Tissue-autolysate	5 cc.
Sodium hexosediphosphate	500 mg.
CO ₂ -NaHCO ₃ or NaHCO ₃ -Na ₂ CO ₃ buffer	50 cc.
Aq. dest.	to 250 cc.
Toluene	5 cc.
37°C.	

Tissue	Time of incubation (hrs.)	Triosephosphoric acid produced (mg. %)			
		pH 6.5	pH 7.2	pH 9.0	pH 9.7
Liver	1	2.3	2.3	2.3	2.3
	24	5.8	5.7	2.8	0.4
Muscle	1	7.9	7.9	7.9	7.9
	24	5.5	5.2	1.9	0.4
Brain	1	6.2	6.2	6.2	6.2
	24	5.6	5.4	2.2	0.5

not due to the subsequent decomposition of the ester once formed, but to the gradual destruction of "zymohexase" at higher alkalinity; there was no notable difference in the velocity of the spontaneous decomposition of triose-ester at pH 7 and 9, but it is shown in Table X that the previous incubation of the enzyme at pH 9 reduced its activity much more markedly than at pH 7. Since a good deal of phosphoric acid liberated by liver tissue is due to the formation of methylglyoxal, the liver liberates phosphoric acid, under these circumstances, more prominently at pH 7 than at pH 9 after a long incubation.

TABLE X.
Influence of Hydrogen-Ion Concentration Activity of
"Zymohexase" (Meyerhof).

Muscle autolysate	2 cc.
Carbonate buffer (pH 7 and 9)	40 cc.
Toluene	2 cc.
37°C.	

After incubating for 10 or 20 hours, 200 mg. of sodium hexosediphosphate were added and diluted to 100 cc. with water. Triosephosphoric acid formed was determined after 15, 30 and 60 minutes' incubation by measuring alkali-hydrolysable phosphoric acid.

pH	Time of previous incubation of enzyme (hrs.)	Triosephosphoric acid formed (mg. %)		
		15 min.	30 min.	60 min.
7.0	0	33.3	41.4	44.9
	10	27.5	36.4	43.6
	20	24.7	35.3	42.6
9.0	0	33.3	41.4	44.9
	10	7.1	11.0	15.3
	20	1.4	2.4	3.1

As the liberation of phosphoric acid from diphosphoric ester can thus involve two cases, that is, the simple hydrolysis and the disintegration into methylglyoxal, the mechanism of the dissolution of diphosphoric ester cannot be discussed, as was done in the past, only from the state of the liberation of phosphoric acid. It is elucidated most correctly by the simultaneous study of the production of free sugar and methylglyoxal. The fact that the liberation of phosphoric acid by the tissue-autolysates took place with much higher velocity in diphosphoric ester than in monophosphoric ester can be explained easily on the ground that the latter ester is decomposed only by phosphatase. It will be recalled here that Kay (1928) suggested the possible existence of two kinds of phosphatase in tissues. He provisionally named the stable phosphatase which was present in kidney and hydrolyzed glycerophosphate the "true phosphatase"; and he called the labile phosphatase which was found in muscle and liberated phosphoric acid from hexose-

diphosphoric acid "the pseudo phosphatase."

The effect of magnesium on the decomposition of diphosphoric ester provided another support to the present writer's view mentioned above. Magnesium accelerated the liberation of phosphoric acid from the ester by autolyzed tissues when it was added to the system at concentrations lower than $m/100$. The rate of acceleration varied according to the kinds of tissues. Table XI shows that it was marked in tissues which were rich in phosphatase, while it was noticed only to a slight extent in tissues which were deficient in the enzyme. As was observed by Hommerberg (1929; 1933), and Jenner and Kay (1931), the accelerating effect of magnesium on bone phosphatase was rather small and it was manifested only at low concentrations. Muscle phosphatase was accelerated by

TABLE XI.

Accelerating Effect of Magnesium on Decomposition of Hexosediphosphate by Various Tissues-Autolysates.

Conditions	MgCl ₂ (mg.)	Incubation (hrs.)	mg. %			
			Free P	Methyl- glyoxal	Mono- ester	Hexose
2 cc. kidney-autolysate + 420 mg. Na-hexosediphosphate + 50 cc. pH 6.2 borate buffer, diluted to 100 cc. 2 cc. toluene. 37°C.	0	24	2.76	4.36	0.41	1.7
		48	7.08	9.00	1.17	2.8
	100	24	24.92	4.30	2.70	13.6
		48	28.80	4.80	2.36	16.4
	300	24	23.27	4.06	2.03	8.9
		48	28.20	4.80	2.09	12.4
5 cc. liver-autolysate + 250 mg. Na-hexosediphosphate + 50 cc. pH 6.2 borate buffer, diluted to 250 cc.	0	24	2.95	3.50	0.54	1.96
		48	5.84	6.86	0.73	3.92
	100	24	6.84	1.12	1.43	12.6
		48	7.26	1.27	1.73	12.7
10 cc. muscle-autolysate warmed at 60°C. for 20 min. + 348 mg. Na-hexosediphosphate + 100 cc. pH 6.2 borate buffer, diluted to 250 cc.	0	24	6.70	14.28	0.13	±
		48	12.48	18.20	0.20	0.6
	300	24	8.17	4.12	0.16	2.2
		48	9.12	4.50	0.62	4.1

magnesium only in the early stage of the reaction. The hydrolysis of monophosphoric ester was also accelerated by magnesium. The important evidence obtained was that the production of methylglyoxal was remarkably low and that the yield of free sugar and monophosphoric ester was greatly increased. This evidence was especially notable in tissues which contained phosphatase abundantly. The effect of magnesium may be explained in the following way. Magnesium, which is the well-known activator of phosphatase, accelerates the simple hydrolysis of diphosphoric ester by phosphatase, resulting in the increase of phosphoric acid, monophosphoric acid and sugar on the one hand, and it inhibits the decomposition of the sugar molecule into methylglyoxal on the other. It was really demonstrated that the hydrolysing action of purified phosphatase on diphosphoric ester was accelerated by magnesium under various conditions (Table XII), and that magnesium inhibited the activity of the "zymohexase" (Table XIII). The inhibitory action of magnesium on the production of triose-ester was not due to the increase of the subsequent hydrolysis of the triose-ester once formed by the accelerated action of phosphatase in the presence of magnesium. This was shown by the fact that the liberation of phosphoric acid was never accelerated by magnesium in the initial stage of the reaction (Table XIII), though it was affected in the later period (Table XIV). The effect of magnesium could be noticed even at 0.0001 M concentration. In the study of the decomposition of diphosphoric ester, the use of its Mg-salt that has been quite frequently made, should be avoided on the ground mentioned above; otherwise the reaction process may be intensely distorted and the true state of the reaction may be shrouded. The monophosphoric ester which was formed from diphosphoric ester by the action of kidney-phosphatase in the presence of $m/500$ magnesium chloride was the mixture of 35% aldo-ester and 65% keto-ester. The reducing power was 76.2% towards Hanes' reagents and 34.6% towards hypoiodite, and $[\alpha]_D^{20} = +15.9^\circ$ (free acid). When the purified kidney phosphatase was used, the monophosphoric ester isolated was exclusively of ketose nature. It did not consume iodine at all; $[\alpha]_D^{20} = +2.0$ (free

TABLE XII.

Accelerating Effect of Magnesium on Purified Phosphatase.

Experiments:—

1 cc. purified kidney-phosphatase + 260 mg. Na-hexosediphosphate.

Series A

No. 1: + 50 cc. pH 7 boric acid-borax buffer

No. 2: + " " " " + 50 mg. MgCl_2

No. 3: + 50 cc. pH 9 boric acid-borax buffer

No. 4: + " " " " + 50 mg. MgCl_2

Series B

No. 1: + 50 cc. pH 7 $\text{NaHCO}_3\text{--CO}_2$ bufferNo. 2: + " " " " + 50 mg. MgCl_2 No. 3: + 50 cc. pH 9 $\text{NaHCO}_3\text{--Na}_2\text{CO}_3$ bufferNo. 4: + " " " " + 50 mg. MgCl_2

All the mixtures were diluted to 100 cc. with water. 2 cc. toluene. 37°C.

No. of exper.		Phosphorus liberated (mg. %)		
		8 hrs.	24 hrs.	48 hrs.
A	1	1.79	4.16	6.77
	2	2.72	6.95	11.71
	3	3.00	4.78	5.76
	4	7.41	12.90	15.11
B	1	7.41	16.51	21.85
	2	16.27	25.49	27.31
	3	10.12	17.90	19.29
	4	18.67	23.22	23.88

acid). Lohmann (1933) stated that the muscle-extract which was made magnesium-free by dialysis liberated one molecule of phosphoric acid from diphosphoric ester and produced the Embden ester, when magnesium was supplied. Based on this observation of Lohmann, Meyerhof and Lohmann (1934 ii) avoided the use of magnesium hexosediphosphate in the experiments concerning "zymohexase."

TABLE XIII.
Inhibitory Effect of Magnesium on "Zymohexase."

Experiments:—

2 cc. muscle autolysate + 400 mg. Na-hexosediphosphate.

Series A

No. 1: + 40 cc. pH 7.0 boric acid-borax buffer

No. 2: + " " " + 50 mg. MgCl_2

No. 3: + " " " + 200 mg. MgCl_2

Series B

No. 1: + 40 cc. pH 9.0 NaHCO_3 - Na_2CO_3 buffer.

No. 2: + " " " + 100 mg. MgCl_2

No. 3: + " " " + 200 mg. MgCl_2

All the mixtures were diluted to 100 cc. with water. 2 cc. toluene. 37°C.

Incubation No. of exper.		Triose formed (mg. %)				Phosphorus liberated (mg. %)		
		15 min.	30 min.	50 min.	60 min.	15 min.	30 min.	60 min.
A	1	43.2	58.8	—	62.9	0	0.29	0.60
	2	40.4	51.6	—	53.7	0	0.29	0.50
	3	34.7	38.9	—	38.2	—	0.29	0.50
B	1	60.2	72.5	76.7	—	—	—	—
	2	50.4	62.2	62.8	—	—	—	—
	3	46.7	56.4	59.4	—	—	—	—

TABLE XIV.
Accelerating Effect of Magnesium on Hydrolysis of Triose-Ester
by Phosphatase.

Experiments:—

No. 1: 0.5 cc. purified kidney-phosphatase + 72.0 mg.

Na-triosephosphate + 50 cc. pH 8.9 NaHCO_3 - Na_2CO_3 buffer

No. 2: " + " + " + 50 mg. MgCl_2

No. 3: 72.0 mg. Na-triosephosphate + 50 cc. buffer.

The mixtures were diluted to 100 cc. with water. 2 cc. Toluene. 37°C.

Incubation No. of exper.		Phosphorus liberated (mg. %)			
		Total amount		Amount due to phosphatase	
		6 hrs.	12 hrs.	6 hrs.	12 hrs.
1		7.67	9.12	4.02	3.92
2		8.99	9.97	5.34	4.77
3		3.65	5.20		

SUMMARY.

It has been realized that the production of hexosemonophosphoric acid and free sugar from hexosediphosphoric acid by autolyzed tissues is not always connected with the formation of methylglyoxal. Monophosphoric acid and free sugar might be the products of the simple hydrolysis of diphosphoric-ester by ordinary phosphatase which does not take part directly in the decomposition of diphosphoric ester into methylglyoxal.

REFERENCES.

- Erdtman, H. (1927): *Z. physiol. Chem.*, **172**, 182.
- Hommerberg, C. (1929): *Z. physiol. Chem.*, **185**, 123.
- Hommerberg, C. (1933): *Biochem. Z.*, **258**, 154.
- Jenner, H. D. and Kay, H. D. (1931): *J. Biol. Chem.*, **93**, 733.
- Kay, H. D. (1928): *Biochem. J.*, **22**, 855.
- Lohmann, K. (1933): *Biochem. Z.*, **262**, 137.
- Meyerhof, O. and Lohmann, K. (1934 i): *Naturw.*, **22**, 134.
- Meyerhof, O. and Lohmann, K. (1934 ii): *Biochem. Z.*, **271**, 89.
- Nakamura, S. (1935): *J. Biochem.*, **21**, 9.
- Neuberg, C. and Leibowitz, J. (1929): *Biochem. Z.*, **191**, 450.

ÜBER DIE PHOSPHODIESTERASE UND DIE LEZITHINHYDROLYSE.

VON

HIDETOSHI UDAGAWA.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Akademie
zu Chiba. Direktor: Prof. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 1. März 1935.)

Phosphodiesterase ist eine spezifische Phosphatase, die den Phosphorsäurediester in 1 Mol. Phosphorsäuremonoester und 1 Mol. Alkohol aufzuspalten imstande ist, aber auf den Phosphorsäuremonoester ganz unwirksam ist. Die letztere Verbindung ist dagegen ein spezifisches Substrat für die Phosphomonoesterase und wird durch dieses Ferment in 1 Mol. Phosphorsäure und 1 Mol. Alkohol gespalten. Um aus dem Phosphorsäurediester fermentativ anorganische Phosphorsäure loszulösen, ist daher die Mitwirkung der Phospho-di- und mono-esterase erforderlich. Die Phosphodiesterase hat ausserdem nichts zu tun mit der Hydrolyse des Diphosphorsäureesters, z.B. der Resorcin-di-phosphorsäure oder der Hexose-di-phosphorsäure. Solche Ester sind einfach durch die Phosphomonoesterase dephosphorierbar, und jeder Phosphorsäurerest in ihnen verhält sich gegen dieses Ferment unabhängig voneinander. Die fermentative Hydrolyse des Phosphorsäurediesters und des Diphosphorsäureesters verläuft also wesentlich verschieden und soll ganz getrennt behandelt werden.

Die fermentative Spaltbarkeit des Phosphorsäurediesters ist schon seit früher bekannt, aber die Aufklärung des hydrolytischen Mechanismus und die Differenzierung der Diesterase und Monoesterase haben wir dem Experiment von Uzawa (1931) zu verdanken. Er hat im Schlangengift frei von der Monoesterase eine spezifische Phosphodiesterase gefunden und konnte ausserdem sowohl aus dem Taka- als auch aus dem Reiskleien-Phosphatasengemisch die diesterasefreie Monoesterase herstellen. Später gelang

Takahashi (1932) die Isolierung der diesterasefreien Monoesterase und Pyrophosphatase aus tierischen Organen und er hat diese Fermente zusammen mit der Schlangengift-diesterase zu seinen enzymatischen Studien der Nukleinsäurestruktur angewandt. Hinsichtlich der fermentativen Analyse der komplizierten Phosphorverbindungen ist auch der Versuch von Satoh (1935) über die Adenosintriphosphorsäure zu erwähnen.

In der vorliegenden Mitteilung berichte ich über die phosphatatische Hydrolyse der Lezithins.

Lezithin ist der Diglyceridphosphorsäurecholinester und darin ist die Phosphorsäure in Diesterform gebunden. Das Lezithinspaltende Ferment wird gewöhnlich Lezithinase oder Lezithase genannt. Aber seine Hydrolyse kann überhaupt sowohl an dem Glyceridrest unter Abspaltung der Fettsäure als auch an dem Phosphorsäureesteranteil stattfinden, und in beiden Fällen nimmt die freie gegen Phenolphthalein titrierbare Säuregruppe zu. Der Glyceridabbau und die Dephosphorierung werden jedoch durch die wesentlich verschiedenen Fermente katalysiert, daher verspricht eine einfache acidimetrische Verfolgung der Lezithinspaltung nichts inbezug auf den dabei fortschreitenden chemischen Prozess. Die Benennung des Ferments ob Lezithase oder Lezithinase ist daher auch nicht genügend definitiv, um die Art und Weise der katalysierenden Reaktion anzugeben. Bei der Lezithinhydrolyse an dem Glyceridrest wird die ungesättigte Fettsäure abgespalten und das Lysolezithin gebildet. Sowohl die Lipase als auch die Butylase, die auf das Glycerid der höheren resp. niedrigen Fettsäuren wirksam sind, vermögen nicht aus dem Lezithin Fettsäure loszulösen. Daher soll das Ferment, das auf das Lezithin oder im allgemeinen auf das Phosphatid oder Phospholipin in solcher Weise einwirkt, dass die Fettsäure daraus abgespalten wird, Phosphatidolipase oder Phospholipase genannt werden. Damit kann man ihre Spezifität und die Wirkungsweise des Ferments klar ausdrücken und weiter dieses Ferment dem zweiten Fermente gegenüber stellen, das den Phosphorsäureesteranteil hydrolytisch angreift. Dieses Ferment spaltet aber nicht das Lezithin oder Phospholipin spezifisch und es ist, wie unten ausführlich erwähnt,

nichts anderes als die Phosphodiesterase, die die verschiedenen Phosphorsäurediester unter Alkoholspaltung in die Phosphorsäuremonoester überführt.

Über die Dephosphorierung des Lezithins hat früher Akamatsu (1923) in Neubergs Institut Untersuchungen angestellt, und er fand in Taka-diastrase ein kräftiges Ferment, das aus Lezithin anorganische Phosphorsäure zu liefern imstande ist. Später hat Kay (1926) eine schwache Lezithasewirkung des Nierenextraktes beobachtet, wobei unter Lezithase ein Dephosphorierungsferment bedeutet wurde, trotzdem hat er dieses Ferment für verschieden von Nierenphosphatase gehalten, weil das Optimum bei Lezithinhydrolyse Ph 7.4 war, während die Glycerophosphatspaltung bei Ph 9 optimal verlief, und ausserdem weil das Lezithin nach der Angabe von Martland und Robison (1926) gegen die Knochenphosphatase resistent war. King, King und Page (1930) haben das Dephosphorierungsvermögen der verschiedenen Gewebeextrakte aus Lezithin, und zwar optimal bei Ph 7.4–7.6, bestätigt, aber in der späteren Mitteilung hat King (1931) die "Lezithase," d.h. das Lezithinspaltende Ferment unter Abspaltung der Phosphorsäure, und die "Phosphatase," das auf Glycerophosphat wirksame Ferment, wegen ihrer verschiedenen Verteilung in den Organen und auch wegen der Nichtübereinstimmung der Ph-Optima als nicht dasselbe Enzym betrachtet. Nach dem Experiment jenes englischen Autors zeigte sein Nierenextrakt hinsichtlich der Wirksamkeit sowohl der "Lezithase" als auch der "Phosphatase" dieselbe Ph-Inaktivierungskurve, und eine maximale Stabilität wurde bei Ph 7.4 beobachtet, als die Fermentlösung in verschiedener Azidität bei 37° 24 Stunden lang aufbewahrt wurde. Von jetziger Kenntnis aus betrachtet ist die "Phosphatase" nichts anderes als die Phosphomonoesterase und andererseits die "Lezithase", das lezithindephosphoriende Ferment, bedeutet ein Gemisch von Phosphodiesterase und Monoesterase. Falls die Monoesterase in der gebrauchten Fermentlösung bei 24 stündigem Aufbewahren solche auffallende Empfindlichkeit gegen OH-Ion geäussert hatte, sollte das Ph-Optimum, das wieder bei 24 stündigen Versuchen mit dem Gemisch von Diesterase und Monoesterase ermittelt wurde,

nicht einfach erläutert werden. Ein Teil des vorliegenden Versuchs steht damit in Zusammenhang. Asakawa (1929) hat sich schon vordem bei den Phosphatasenstudien mit der Hydrolyse des Diesters beschäftigt, aber es wurde später von Uzawa (1931) die Differenzierung der Di- und Monoesterase ausgeführt, und seitdem behandeln wir die Wirkung der beiden Fermente je spezifisch für die Esterform der Phosphorsäure.

Im Lecithinmolekül ist die Phosphorsäure in Diesterform vorhanden. Für das Dephosphorieren dieses Lipoides ist daher wie bei der Diphenylphosphorsäure die Mitwirkung der Di- und Monoesterase erforderlich. Das Lecithin muss daher zuerst in Phosphorsäuremonoester und Oxyverbindung abgebaut werden. Die wichtige Frage taucht auf, welche Spaltprodukte des Lecithins entstehen durch die Wirkung der Phosphodiesterase; sind sie die Glyceridphosphorsäure und Cholin oder Glycerid und Cholinphosphorsäure? Zur Entscheidung dieser Frage müssen die Versuche mit der monoesterasefreien Diesterase ausgeführt werden. Als solches Ferment kennt man das Habu-Gift. Um die Ph-Abhängigkeit der Habu-Diesterase zu untersuchen, habe ich zuerst das Ferment bei verschiedenem Ph auf das Diphenylphosphat einwirken lassen und dann den entstandenen Phosphorsäuremonophenylester fermentativ so bemessen, dass die Reaktionslösungen sämtlich zu Ph 3.2 angesäuert, gepuffert und dann erhitzt wurden, um die Diesterasewirkung zu unterbrechen, dann mit der Phosphomonoesterase von erstem Typus versetzt wurden, um nach 24 Stunden die abgespaltene anorganische Phosphorsäure kolorimetrisch zu bestimmen. Die kräftige Monoesterase I, die bei Ph 3.2 optimal wirkt, ist nach Kurata (1931) aus Schweineleberautolysat leicht zu bereiten; sie ist diesterasefrei. Dass die auf solche Weise bestimmte anorganische Phosphorsäure sich auf das Monophenylphosphat bezieht, ist wohl verständlich. Durch diese fermentative Bemessung des Monophenylphosphats wurde das Optimum der Habu-Diesterase als Ph 9 beobachtet. Mit dieser Diesterase wurde in gleicher Weise der Versuch der Lecithin- oder Lysolecithinhydrolyse angestellt. Das Ph-Optimum wurde auch bei Ph 9 beobachtet. Daher habe ich weiter bei Ph 9 die Habu-Di-

esterase auf das Lezithin einwirken gelassen und nach 1 und 3 Tagen in der Reaktionslösung das freie Cholin nach Roman(1930) bestimmt. Die Zunahme des freien Cholins wurde dabei festgestellt, während unter derselben Bedingung die Lezithinemulsion ohne dem Diesterasezusatz das freie Cholin nicht lieferte. Die Cholinabspaltung war nach 1 Tage 2.1% und nach 3 Tagen 8.1%. Falls dieses 3 tägige Lezithinhydrolysats weiter bei Ph 3.2 durch die Phosphomonoesterase 24 Stunden hydrolysiert wurde, waren 3.6% gesamten Phosphors als anorganische Phosphorsäure abgespalten, was eindeutig zeigte, dass in 24 Stunden das entstandene Glyceridphosphat bei Ph 3.2 durch die Lebermonoesterase nicht total hydrolysierbar war. Man erkennt durch diese Versuchsreihe, dass das Lezithin und Lysolezithin genau wie die Diphenylphosphorsäure durch die Phosphodiesterase optimal bei Ph 9 und zwar in ein Mol. Glyceridphosphorsäure und 1 Mol. Cholin ausgespalten werden. Dieses Ergebnis ist sehr interessant, weil ich, wie später erwähnt, einen anderen Hydrolysemechanismus bei der Taka-Diesterase beobachtet habe.

Asakawa (1929) hat das Ph-Optimum der Diesterhydrolyse durch das Nierenphosphatasengemisch als Ph 7.8 angegeben. Dasselbe Optimum wurde von Kay (1926) und King (1930, 1931, 1934) bei der Lezithindephosphorierung durch das Phosphatasengemisch aus verschiedenen Organen beobachtet. Kürzlich hat Hotta (1934) mit der Nierenphosphatase die Phosphorsäureabspaltung aus den Diestern bei verschiedenen Aziditäten untersucht und zwei Optima bei Ph 5 und 7.8 beobachtet. Es ist uns noch nicht gelungen, die tierischen Diesterasen in einem von den Monoesterasen freien Zustand zu isolieren. Wir sind aber nun der Meinung, dass in den tierischen Organen wenigstens zwei Arten Diesterase vorhanden sind, von denen eine ihr Optimum, wie die Habu-Diesterase, bei Ph 9 besitzt, während die andere, wie die später zu erwähnende Taka-Diesterase, bei Ph 5-6 optimal wirkt. Es gibt andererseits in den Organen 3 Arten Monoesterase, deren Optima Ph 3.2, 5.6 bzw. 9 sind. Je nach den Organarten und der Herstellungsweise der Extrakte soll der Gehalt einer Fermentlösung an den drei Monoesterasen sowie den zwei Diesterasen

verschieden sein. Wenn die Fermentlösung z.B. vorwiegend die Monoesterase vom dritten Typus (Optimum=Ph 9) und die Diesterase, die in saurer Reaktion optimal wirkt, enthält, soll die maximale Ausbeute an dem anorganischen Phosphat nicht bei Ph 9 oder 5-6, sondern in der dazwischen liegenden Azidität erwiesen werden, die selbstverständlich durch die relative Aktivität der beiden Fermente bedingt wird. Unter derselben Voraussetzung habe ich die Habu-Diesterase und die Lebermonoesterase I zusammen auf Diphenylphosphorsäure, Lezithin oder Lysolezithin wirken lassen und die maximale Dephosphorierung bei Ph 7 beobachtet. Dieser Versuch wurde bloss darum ausgeführt, um zu zeigen, dass man das maximale Dephosphorieren des Diesters bei einem Ph nicht ohne weiteres mit dem Optimum irgendeines Ferments in Zusammenhang stellen darf, soweit die Reaktion durch die Mitwirkung von zwei verschiedenen Fermenten katalysiert wird.

Über die zweite Art von Diesterase wäre folgendes zu sagen: Es ist seit früher bekannt, dass in der Takadiastase ausser der Monoesterase, die bei Ph 3.2 optimal wirkt, noch eine Diesterase vorhanden ist und dieses Fermentpräparat daher imstande ist, die Phosphorsäurediester in 2 Mol. Alkohol und 1 Mol. Phosphorsäure abzubauen, wobei die maximale Hydrolyse nach der Angabe von Asakawa (1929) bei Ph 5.6 stattfindet. Mit dieser Azidität darf man aber aus dem oben erwähnten Grund nichts über das Optimum der Diesterase aussagen, soweit der Versuch mit der isolierten Diesterase nicht angestellt wird. Das Gewinnen der Monoesterase frei von der Diesterase war leicht möglich, aber die monoesterasefreie Diesteraseherstellung aus dem Phosphatasengemisch gelang bisher niemand. Ich habe daher an der dialysierten Takadiastase-lösung die fraktionierende Trennung der Monoesterase und Diesterase unternommen. Zum Nachweis der Monoesterase bediente ich mich des Ansatzes mit dem Monophenylphosphat bei Ph 3.2, weil die Taka-Phosphomonoesterase zu dem ersten Typus gehört und in dieser Azidität optimal wirkt. Das Monophenylphosphat ist eines der am leichtesten spaltbaren Substrate und falls es nicht selbst nach 24 Stunden gespalten wird, kann man wohl die Existenz der Monoesterase ausschliessen. Zum Nachweis der Di-

esterase wurde die zu untersuchende Fermentlösung mit der Lebermonoesterase gemischt, bei Ph 5.6 auf das Diphenylphosphat einwirken gelassen und das anorganische Phosphat wurde gemessen. Das Ph-Optimum der Lebermonoesterase ist 3.2, aber diese Fermentlösung war stark genug, um das intermediär entstehende Monophenylphosphat selbst bei Ph 5.6 in 24 Stunden total aufzuspalten. Für die Trennung der Mono- und Di-esterase habe ich zuerst die fraktionierte Fällung der Fermentlösung mit Alkohol oder Aceton in saurer, neutraler sowie alkalischer Reaktion unternommen, aber das relative Konzentrieren der Diesterase wurde nicht erreicht. Demnächst wurden dazu die Adsorptionsverfahren angewandt, indem als Adsorptionsmittel Kaolin, Tonerde, Eisenhydroxyd, Eisenphosphat oder Magnesiumoxyd gebraucht wurde und die Azidität der Fermentlösung vorher zu verschiedenen Ph mit Puffer reguliert wurde. Die mühsamen Versuche ergaben leider kein zufriedenstellendes Resultat. Die Herstellung der monoesterase-freien Taka-Diesterase war mir jedoch endlich gelungen, als die dialysierte Takadiastaselösung mit Azetat schwach alkalisch gemacht, mit Chloroform gesättigt und mit Magnesiumcarbonat geschüttelt und die Adsorptionsrestlösung gegen destilliertes Wasser dialysiert wurde. Die so hergestellte Diesteraselösung war nicht mehr imstande, aus dem Monophenylphosphat bei Ph 3.2 oder 5.6 nach 24 Stunden anorganisches Phosphat zu liefern. Bei diesem Adsorptionsverfahren war ein ziemlich grosser Verlust der Diesterase nicht vermeidbar, trotzdem musste man mit der abgeschwächten Diesterase zufrieden sein, um die Anwesenheit der Monoesterase sicher auszuschliessen.

Mit dieser isolierten Taka-Diesterase habe ich, wie mit der Habu-Diesterase, die Hydrolyse des Diphenylphosphats bei verschiedenen Aziditäten untersucht, indem das entstandene Monophenylphosphat bei Ph 3.2 mittels der Lebermonoesterase I aufgespalten und dann das anorganische Phosphat gemessen wurde. Das Optimum war Ph 6. Der Versuch der Lysolecithinhydrolyse wurde dann in gleicher Weise angestellt. Das Ph-Optimum wurde bei 4-5 beobachtet. Es bleibt dahingestellt, warum dieselbe Taka-diesterase das Diphenylphosphat bei Ph 6 optimal hydrolysiert.

während sie das Lysolezithin bei Ph 4-5 optimal angreift.

Es ist aber die wichtige Frage, was sind die Spalteprodukte des Phosphatids durch die Taka-Diesterase; Glyceridphosphorsäure + Cholin oder Glycerid + Cholinphosphorsäure? Der Versuch wurde mit den Lysolezithin ausgeführt, denn die hergestellte Diesterase war nicht stark gerung, um mit dem Lezithin zu arbeiten. Bei Ph 4.7 wurde die Lysolezithin-Emulsion mit der Taka-Diesterase behandelt und nach 3 Tagen war aber das freie Cholin nicht nachzuweisen. Wenn das Lysolezithin überhaupt durch die Taka-Diesterase angreifbar ist, aber dabei kein freies Cholin abgespalten wird, müssen die Spaltprodukte Glycerid und Cholinphosphorsäure sein, die leider quantitativ nicht leicht zu messen sind. Um den Beweis dafür zu führen, habe ich die Lysolezithinlösung mittels der Taka-Diesterase + Lebermonoesterase bei Ph 5 drei Tage hydrolysiert und in der Reaktionslösung das anorganische Phosphat und das freie Cholin bestimmt. Wenn das Cholinphosphat, aber nicht das Glycerophosphat, durch die Wirkung der Taka-Diesterase intermediär gebildet werden sollte, dann muss das gemessene anorganische Phosphat und Cholin 1:1 sein. Es war in der Tat der Fall. Nach 3 Tagen wurden 8.2% des gesamten Cholins und 8.3% des gesamten Phosphors abgespalten. Dieses Ergebnis ist sehr interessant, wenn es mit dem Habu-Diesteraseversuch verglichen wird.

Beide Arten von Diesterase vermögen also das Diphenylphosphat in den Monoester überzuführen. Aber die Habu-Diesterase wirkt bei Ph 9 optimal, während die Taka-Diesterase bei Ph 6 ihre optimale Wirkung ausübt. Das Lezithin und Lysolezithin sind auch durch die zwei Diesterasen spaltbar. Der Angriffspunkt von beiden Fermenten ist jedoch in bemerklicher Weise verschieden. Die Habu-Diesterase spaltet aus dem Phosphatid das Cholin ab und lässt die Bindung von Glyceridphosphorsäure intakt. Die Taka-Diesterase löst dagegen jene Bindung zwischen Glycerid und Phosphorsäure und liefert die Cholinphosphorsäure als das Spaltprodukt. Sowohl das Cholinphosphat als auch das Glyceridphosphat sind durch die Monoesterase hydrolysierbar. Das Phosphatid ist daher einerseits durch die Phospholipase oder Phospha-

tidolipase in die Lysoverbindung überführbar und andererseits kann es durch die Phosphodiesterase und Monoesterase dephosphoriert werden, wobei aber kein besonderes Ferment anzunehmen ist. Die Benennung Lecithase oder Lecithinase ist zu undeutlich, um die Wirkungsweise des Ferments klar anzuzeigen.

Experimenteller Teil.

Die ganzen Versuche hindurch war die Temperatur 37° . Die Pufferlösung war Veronal-Acetat-Salzsäure von Michaelis(1931), $M/10$ Glykokoll-Natron, $M/10$ Glykokoll-Salzsäure oder $M/2$ Essigsäure-Acetat. Ph wurde jedesmal an dem Versuchsansatz elektrometrisch ermittelt.

Die Bestimmung des anorganischen Phosphats nach Fiske-Subbarow (1925). In den nachstehenden Tabellen werden die gemessenen Mengen anorganischen Phosphats als P in mg für 2.5 ccm Versuchsansätze umgerechnet und nebenbei auch die ausgerechneten Prozentsätze angegeben.

Cholin wurde nach Roman (1930) bestimmt. Bei der Titration wurde die Mikrobürette gebraucht. 1 ccm gebrauchter $N/100$ Thiosulfatlösung entspricht 0.1345 mg Cholin. In den nachstehenden Tabellen werden die titrierte Thiosulfatlösung in ccm und das ermittelte Cholin in mg je für 2.5 ccm Versuchsansätze umgerechnet angegeben. Um die bei verschiedenen Aziditäten gepufferten Lösungen für die Monoesteraseversuche zu Ph 3.2 anzusäuern, wurde den Lösungen die aus ihrem Puffergehalt berechnete Menge $N/10$ Salzsäure zugesetzt. Bei dem Glykokoll-Natronpuffer war die zuzusetzende Salzsäure die Summe von der dem Natron äquivalenten Menge und der mit dem Glykokoll das Puffer von Ph 3.2 darzustellenden Menge. Das Puffer von Michaelis reicht von Ph 3 bis 9 und besteht aus einer bestimmten Menge von Veronal und Acetat einerseits und einer variierenden Menge von Salzsäure andererseits. Ein Puffergemisch von jeder Zusammensetzung kann daher durch Zusatz von der leicht auszurechnenden Salzsäuremenge zu Ph 3.2 umgestellt werden.

I. DIE SUBSTRATE.

Kalium Monophenylphosphat und Diphenylphosphat wurden früher von Asakawa (1929) hergestellt und im hiesigen Institut aufbewahrt. Lezithin wurde nach der Angabe von Sueyoshi (1931) aus Eigelb dargestellt. Das gesamte P-Gehalt war 3.91%. Das Lysolezithin nach Levene, Rolf und Simms (1924)

Analyse des Lysolezithins, $C_{24}H_{50}NO_8P$ (511.5) :

Berechnet P 6.07%,

Gefunden P 5.92%.

Das für die Darstellung gebrauchte Habu-Gift wurde uns von dem kaiserlichen Institut für Infektionskrankheiten überlassen, wofür ich dem Herrn Dr. S. Hosoya zu verbindlichstem Dank verpflichtet bin.

II. DIE FERMENTE.

a) Die Phosphomonoesterase wurde ausschliesslich für die Spaltung der Monoester gebraucht, die aus den Diestern durch die Diesterase gebildet waren. Sie wurde nach Kurata (1931) aus Schweineleberextrakt durch das Adsorptionsverfahren hergestellt und die dialysierte Lösung wurde weiter unter vermindertem Druck bei 37° konzentriert. Dieses Ferment wirkt optimal bei Ph 3.2 und ist frei von der Diesterase. Der Versuchsansatz von 5.0 ccm Monoesterase + 5.0 ccm M/100 Glycerophosphat + 5.0 ccm M/10 Glykokoll-Salzsäure + 5.0 ccm Wasser (Ph=2.93) zeigte bei 37° in 2 Stunden 68%ige Hydrolyse.

b) Als Habu-Diesterase gebrauchte ich eine 0.1%ige Giftlösung in physiologischer Kochsalzlösung. Sie wurde jedesmal frisch bereitet.

c) Die Taka-Diesterase wurde wie folgt hergestellt: 5% Takadiastaselösung wird im Kollodiumsack gegen destilliertes Wasser dialysiert. 5.0 ccm der Lösung werden dann mit 1.0 ccm M/2 Natriumacetat + 4.0 ccm Wasser + 5 Tropfen Chloroform gemischt und mit 0.5 g Magnesiumcarbonat (Kahlbaum) bei Zimmertemperatur eine Stunde geschüttelt. Nach dem Zentrifugieren filtriert man die überstehende Flüssigkeit und dialysiert das

Filtrat wieder im Kollodiumsack gegen destilliertes Wasser. Diese Herstellung der Taka-Diesterase ist reproduzierbar.

Die so bereitete Diesteraselösung übt z.B. die folgenden Wirkungen aus.

<i>M</i> /100 Diphenylphosphat		5.0 ccm	0 ccm	0 ccm
<i>M</i> /100 Monophenylphosphat		0	5.0 „	5.0 „
Taka-Diesterase		5.0 „	5.0 „	0 „
Leber-Monoesterase		5.0 „	0 „	0 „
<i>M</i> /2 Essigsäure-Acetat		5.0 „	5.0 „	5.0 „
Wasser		0 „	5.0 „	10.0 „
Ph		5.6	5.6	5.6
P Nach 24 Stdn.	in mg	0.0096	0	0
	%	4.9	0	0

Die in gleicher Weise mit *M*/10 Glykokoll-Salzsäurepuffer angestellten Versuche von Ph 3 ergaben bei keinem Ansatz Dephosphorierung. Die Fermentlösung war also als eine monoesterasefreie Diesteraselösung brauchbar.

III. DIE VERSUCHSANORDNUNG.

Die Versuche wurden im allgemeinen wie folgt ausgeführt. Zuerst wurde folgenden Gemisch bereitet.

Substratlösung	5.0 ccm
Phosphodiesterase	5.0 „
Puffer	20.0 „

3–4 ccm davon dienten zur Ph-Bestimmung und 10 ccm zum B-Versuch. Die zurückbleibenden 16–17 ccm wurden für den A-Versuch gebraucht.

A-Versuch: Das Substrat-Diesterasegemisch wurde im Brutschrank bei 37° stehen gelassen. Nach 1–3 Tagen wurden 10 ccm davon für den weiteren Monoesteraseversuch auspipettiert. An 5 ccm der zurückbleibenden Lösung prüfte ich kolorimetrisch die Anwesenheit des anorganischen Phosphats. Es fehlte bei allen Fällen, was für die Stabilität der Substrate und die Monoesterase-

freiheit der gebrauchten Diesteraselösung spricht. Zur weiteren Monoesterasewirkung wurden die oben erwähnten 10.0 ccm durch Versatz mit der berechneten Menge $N/10$ Salzsäure (a ccm) und $5 - a$ ccm Wasser auf 10 ccm gemacht, wobei das Gemisch zu Ph 3.2 angesäuert wurde, in siedendes Wasserbad 5 Minuten eingetaucht, um die Diesterase zu inaktivieren, und nach Abkühlen mit 5.0 ccm Lebermonoesterase versetzt. Prüfung von Ph elektrometrisch. Der Ansatz wurde wieder in den Brutschrank gestellt. Nach 24 Stunden wurde das abgespaltene Phosphat kolorimetrisch bestimmt.

B-Versuch: 10.0 ccm des Substrat-Diesterasegemisches wurden sofort mit 5.0 ccm Phosphomonoesterase und 5.0 ccm Wasser versetzt, wobei das primär gepufferte Ph sich nicht veränderte, und in den Thermostat von 37° gestellt. Nach 1–3 Tagen wurde das entstandene anorganische Phosphat kolorimetrisch bestimmt.

IV. VERSUCHE MIT DER HABU-DIESTERASE.

a) *Diphenylphosphatspaltung.*

Die zu den A und B Versuchen dienende Lösung bestand aus:

<i>M/25</i> Diphenylphosphat	5.0 ccm
0.1% Giftlösung	5.0 „
Pufferlösung	20.0 „

A-VERSUCH.

(24 stündige Diesterasewirkung bei verschiedener Azidität und 24 stündige Monoesterasewirkung).

Ph bei Diesterase- wirkung	Ph bei Monoesterase- wirkung	P	
		in mg	%
3.21	3.21	0	0
4.11	3.20	0	0
4.93	3.21	spur	0
6.12	3.21	0.0070	2.7
6.97	3.21	0.0152	5.8
7.91	3.23	0.0425	16.4
8.92	3.21	0.0547	21.1
9.68	3.32	0.0401	15.5

B-VERSUCH.

(24 stündige Zusammenwirkung der Di- und Mono-esterase).

Ph	P	
	in mg	%
3.21	0	0
4.11	0	0
4.93	0.0104	4.0
6.12	0.0195	7.5
6.97	0.0250	9.6
7.91	0.0170	6.5
8.92	0	0

b) *Lezithinspaltung.*

Die Stammlösung bestand aus:

1.92% Lezithinemulsion	5.0 cem
0.1% Giftlösung	5.0 „
Pufferlösung	20.0 „

A-VERSUCH.

(72 stündige Habu-Diesterasewirkung und 24 stündige Monoesterasewirkung).

Ph bei Diesterase- wirkung	Ph bei Monoesterase- wirkung	P	
		in mg	%
3.19	3.19	0	0
4.16	3.20	0	0
4.92	3.22	0	0
6.13	3.20	0.0015	0.9
6.98	3.22	0.0027	1.6
7.91	3.20	0.0036	2.2
8.90	3.20	0.0058	3.6
9.68	3.32	0.0039	2.4

B-VERSUCH.

(72 stündige Zusammenwirkung von Di- und Monoesterase).

Ph	P	
	in mg	%
3.19	0	0
4.16	0	0
4.92	0.0020	1.2
6.13	0.0041	2.5
6.98	0.0048	3.0
7.91	0.0042	2.6
8.90	0	0

c) *Lysolezithinspaltung.*

Als Stammlösung wurde das folgende Gemisch bereitet.

1.3% Lysolezithinemulsion	5.0 ccm
0.1% Giftlösung	5.0 „
Puffer	20.0 „

A-VERSUCH.

(72 stündige Habu-Diesterasewirkung und 24 stündige Monoesterasewirkung).

Ph bei Diesterase- wirkung	Ph bei Monoesterase- wirkung	P	
		in mg	%
3.19	3.19	0	0
4.11	3.22	0	0
4.90	3.19	0	0
6.11	3.20	0.0023	1.4
6.98	3.20	0.0037	2.2
7.89	3.19	0.0050	3.0
8.90	3.22	0.0078	4.7
9.69	3.30	0.0057	3.4

B-VERSUCH.

(72 stündige Zusammenwirkung von Di- und Monoesterase).

Ph	P	
	in mg	%
3.19	0	0
4.11	0	0
4.90	0.0029	1.7
6.11	0.0047	2.8
6.98	0.0069	4.1
7.89	0.0054	3.2
8.90	0	0
9.69	0	0

d) Die Cholinabspaltung aus dem Lezithin durch
Habu-Diesterase.

Die Versuchslösungen bestanden aus:

	A. Hauptversuch	B. Kontrolle I	C. Kontrolle II
1.5% iges Lezithin	18.0 ccm	18.0 ccm	0 ccm
M/10 Glykokollnatron	6.0 „	6.0 „	6.0 „
0.1% ige Giftlösung	6.0 „	0 „	6.0 „
Wasser	6.0 „	12.0 „	24.0 „

Ph war 8.9. Das freie Cholin wurde jodometrisch bestimmt.

Zeit	A	B	C	A-(B+C)	Cholin	
					in mg	%
sofort	0.165 ccm	0.165 ccm	0 ccm	0 ccm	0 ccm	0
nach 1 Tag	0.660 „	0.180 „	0 „	0.480 „	0.064 „	2.1
nach 3 Tagen	1.957 „	0.180 „	0 „	1.777 „	0.235 „	8.1

V. VERSUCHE MIT DER ISOLIERTEN TAKA-DIESTERASE.

An dieser Fermentlösung wurden nur die A-Versuche ausgeführt.

a) *Diphenylphosphatspaltung.*

Die Stammlösung bestand aus:

<i>M</i> /50 Diphenylphosphat	10.0 ccm
Taka-Diesterase	10.0 „
Puffer	10.0 „

A-VERSUCH.

I.—24 stündige Diesterasewirkung und 24 stündige Monoesterasewirkung.

II.—48 stündige Diesterasewirkung und 24 stündige Monoesterasewirkung.

Ph bei Diesterase- wirkung	I			II		
	Ph bei Monoesterase- wirkung	P in mg	%	Ph bei Monoesterase- wirkung	P in mg	%
3.20	3.20	0 •	0	3.20	0	0
4.15	3.22	0.0043	1.6	3.32	0.0070	2.7
4.95	3.20	0.0064	2.3	3.20	0.0101	3.9
6.12	3.20	0.0136	5.2	3.20	0.0240	9.2
6.89	3.22	0.0081	3.1	3.20	0.0141	5.4
7.89	3.18	0	0	3.19	0	0

b) *Lysolezithinspaltung.*

Die Stammlösung bestand aus:

1.2% Lysolezithinemulsion	10,0 ccm
Taka-Diesterase	10.0 „
Fermentlösung	10.0 „

I.—72 stündige Diesterasewirkung und 24 stündige Monoesterasewirkung.

II.—168 stündige Diesterasewirkung und 24 stündige Monoesterasewirkung.

Ph bei Diesterase- wirkung	I			II		
	Ph bei Monoesterase- wirkung	P in mg	%	Ph bei Monoesterase- wirkung	P in mg	% •
3.21	3.21	0.0020	0.6	3.21	0.0072	2.3
4.13	3.21	0.0233	7.6	3.19	0.0379	12.4
4.91	3.21	0.0250	8.2	3.22	0.0390	12.8
6.11	3.19	0.0209	6.8	3.21	0.0281	9.2
6.90	3.21	0.0200	6.5	3.19	0.0264	8.7
7.89	3.22	0.0033	1.0	3.22	0.0100	3.2

c) Die Cholinabspaltung aus Lysolezithin durch
Taka-Diesterase.

Die Versuchslösung bestand aus:

	A. Hauptversuch	B. Kontrolle I	C. Kontrolle II
2% iges Lysolezithin	6.0 ccm	6.0 ccm	0 ccm
Essigsäureacetatpuffer	6.0 „	6.0 „	6.0 „
Fermentlösung	6.0 „	0 „	6.0 „
Wasser	0 „	6.0 „	6.0 „

Ph war 4.74. Die Cholinbestimmung nach Roman.

Zeit	A	B	C	A-(B+C)	Cholin	
					in mg	%
sofort	0.150 ccm	0.142 ccm	0 ccm	0.008 ccm	0.0010	0.0
nach 3 Tagen	0.195 „	0.135 „	0 „	0.060 „	0.0080	0.2

Die Bildung von freiem Cholin war nicht zu bemessen, aber als die Taka-Diesterase dagegen zusammen mit der Monoesterase einwirkte, wurde die Cholinabspaltung wohl beobachtet und interessanter Weise im äquivalenten Verhältnis das anorganischer Phosphat. Die Versuchslösung war dabei wie folgt zusammengestellt.

	A. Hauptversuch	B. Kontrolle I	C. Kontrolle II
0.98% iges Lysolezithin	18.0 ccm	18.0 ccm	0 ccm
Essigsäureacetatpuffer	6.0 „	6.0 „	6.0 „
Taka-Phosphodiesterase	6.0 „	0 „	6.0 „
Phosphomonoesterase	6.0 „	0 „	6.0 „
Wasser	0 „	12.0 „	18.0 „

Ph war 5.06. Cholinbestimmung nach Roman.

Zeit	A	B	C	A-(B+C)	Cholin	
					in mg	%
sofort	0.180 ccm	0.177 ccm	0 ccm	0.003 ccm	0.0004	0.01
nach 3 Tagen	1.965 „	0.187 „	0 „	1.778 „	0.2391	8.2

Phosphorbestimmung nach Fiske-Subbarow.

Zeit	A	B	C	A-(B+C)	%
sofort	0 mg	0 mg	0 mg	0 mg	0
nach 3 Tagen	0.0618 „	0 „	0 „	0.0618 „	8.3

LITERATUR.

- Akamatsu, S. (1923): *Biochem. Z.*, **142**, 186.
 Asakawa, K. (1929): *J. of Biochem.*, **11**, 143.
 Fiske, C. H. u. Subbarow, Y. (1925): *J. of Biol. Chem.*, **66**, 375.
 Hotta, R. (1934): *J. of Biochem.*, **20**, 343.
 Kay, H. D. (1926): *Biochem. J.*, **20**, 791.
 King, H., King, E. J. u. Page, I. H. (1930): *Z. physiol. Chem.*, **191**, 243.
 King, E. J. (1931): *Biochem. J.*, **25**, 799.
 King, E. J. (1934): *Biochem. J.*, **28**, 476.
 Kurata, K. (1931): *J. of Biochem.*, **14**, 25.
 Levene, P. A., Rolf, I. P. u. Simms, H. S. (1924): *J. of Biol. Chem.*, **38**, 859.
 Martland, M. u. Bobison, R. (1926): *Biochem. J.*, **20**, 847.
 Michaelis, L. (1931): *Biochem. Z.*, **234**, 139.
 Roman, W. (1930): *Biochem. Z.*, **219**, 218.
 Satoh, T. (1935): *J. of Biochem.*, **21**, 19.
 Sueyoshi, Y. (1930): *J. of Biochem.*, **13**, 143.
 Takahashi, H. (1932): *J. of Biochem.*, **16**, 447.
 Takahashi, H. (1932): *J. of Biochem.*, **16**, 463.
 Uzawa, S. (1931): *J. of Biochem.*, **15**, 19.

CHEMICAL STUDIES OF THE PROTEINS OF FEEDING-STUFFS.

V. The Contents of Cystine and Tryptophane.

By

TETSUO TOMIYAMA.

(From the Imperial Fisheries Institute, Tokyo)

(Received for publication, March 2, 1935)

In the first report (1934), it was shown that the protein of soy bean contained a far smaller amount of methionine than does either protein of silk-worm pupa or that of sardine. As regards lysine- and histidine-content, the second report (1934) showed that there was practically no difference among the proteins except that the lysine content of soy bean protein was little lower than the others.

The present work has been carried out in order to compare these three proteins with one another as to their contents of the other indispensable amino acids, namely cystine and tryptophane. The rôle of cystine in nutrition can be replaced without fail by methionine (1932), so that it is necessary to take the sum of these two sulfur containing amino acids as a criterion for the comparison of nutritional value of proteins. Now, if it is assumed that Baernstein's statement (1932) is valid for every protein, that is, that the total sulfur in any protein consists exclusively of cystine sulfur and methionine sulfur, methionine content can be calculated when total sulfur and cystine are determined. Total sulfur was determined by Denis-Benedict method (1910). The determinations of cystine and tryptophane were carried out by using Okuda's iodine method (1926) for the former and Tomiyama-Shigematsu method (1934) for the latter. The latter method is a colorimetric one; namely, a sample protein is treated with 19 per cent HCl containing Ehrlich reagent, kept at 30°C for 7-8 days, and the color thus developed is matched against a standard reduced

phosphomolybdate colour which has been evaluated by pure tryptophane. The results obtained are given in Table I.

TABLE I.

Sample protein	Cystine	Methionine		Cystine + Methionine	Tryptophane
		(1)	(2)		
Protein of silk-worm pupa	0.86	0.43	2.97	3.83	1.50
Protein of sardine	0.76	0.52	3.14	3.90	1.40
Protein of soy bean	1.05	0.08	1.96	3.01	1.35

(1) Isolated quantities.

(2) $(\text{Total-sulfur} - \text{cystine-sulfur}) \times \frac{149.16}{32} = \text{Methionine}$

As to a tryptophane content, there is hardly any difference among the three proteins. On the other hand, the cystine content of the protein of soy bean is much higher than that of the other two proteins, but the content of methionine is quite contrary to that of cystine in the soy bean protein. Regarding the sulfur containing amino acid as a whole, only a little difference is found between the protein of soy bean and any of the others.

The author wishes to express his indebtedness to Mr. K. Katai for his assistance in the determination of cystine.

REFERENCES.

- Baernstein, H. D. (1932): *ibid.*, **97**, 669.
 Denis, W. (1910): *ibid.*, **8**, 401.
 Jackson, R. W. and Block, R. J. (1932): *J. Biol. Chem.*, **98**, 465.
 Okuda, Y. (1926): *Proc. Imp. Acad. Tokyo*, **2**, 277.
 Tomiyama, T. (1934): *Bull. Soc. Scient. Fisheries*, **2**, 258.
 Tomiyama, T. and Kashiwada, K. (1934): *ibid.*, **2**, 287.
 Tomiyama, T. and Shigematsu, S.: Under printing in *J. Biol. Chem.*

ÜBER DEN BENCE-JONES'SCHEN EIWEISSKÖRPER.

VON

HIKOYA TSUTSUI.

(Aus dem Kyoundo Hospital in Tokio. Direktor: Dr. T. Sasaki.)

(Eingegangen am 30 März 1935)

Bei Fällen einiger Knochenmarkerkrankungen, multipler Myelome, Osteosarkom, Osteomalacie und Leukämie scheidet sich ein besonderer Eiweisskörper im Harn aus, der beim Erwärmen auf 40–60°C die Gerinnung und weiter auf 100°C eine Lösung erfährt, beim Abkühlen aber wieder erscheint. Bence-Jones fand zuerst diese Albuminurie. Seither spricht man vom Bence-Jone'schen Eiweisskörper. Magnus-Levy, dann Abderhalden und Rostoski lieferten grosse Beiträge zu dessen Erforschung. Magnus-Levy isolierte ihn aus dem Harn im kristallisierten Zustand. Weiter hydrolysierte Abderhalden ihn und isolierte nach Fischer's Estermethode verschiedene Aminosäuren, von denen Leucin, Glutaminsäure, Asparaginsäure und Alanin überwiegen. Es gelang ihm ausserdem, wenn auch in spärlicher Menge, diesen Körper aus dem kranken Serum darzustellen. Dieser steht in seinen chemischen Eigenschaften der Albumose nahe. Jedoch hielt man ihn im allgemeinen für einen besonderen Eiweisskörper, weil er ein schwaches Antigen werden kann.

Hopkins konnte ihn nicht im kranken Knochenmark selbst nachweisen. Dagegen konnte Ellinger eine spärliche Menge davon im kranken Knochenmark feststellen. Abderhalden injizierte dem Kaninchen dieses Eiweiss, bzw. entsprechende Menge des Harns und danach zeigte sich weder Eiweiss noch Albumosen, bzw. Pepton im Harn desselben Tiers. Daraus schloss er, dass es sich um wenig abgebautes Eiweiss handelt. Neuerdings hatte ich die Gelegenheit, diese Albuminurie zu untersuchen. Die Hauptklagen des Patienten lagen in heftigem Lendenschmerz und Harntrübung. Ausführliche Klinik demonstrierte Herr Dr. K. Mori in der Koshinversammlung. Kurz sei hier bemerkt, dass in diesem Fall

nirgends der an Myelome erinnernde Schattendefekt nachzuweisen ist. Aber der Röntgenolog bestätigte allgemeine Atrophie des ganzen Skelettsystems. Seit der Aufnahme stellten sich zuweilen Polydipsie und Polyurie ein, die den Verdacht auf Diabetes insipidus zuliessen. Als Erstes studierte ich die Wirkung der Wärme und verschiedener chemischer Reagentien auf diesem Körper.

Reaktionen des Eiweisskörpers im Urin.

- 1) Nach der Ansäuerung des Harns mit Essigsäure bei 55–60°C Ausfällung, teilweise Klärung bei 100°C. Beim Abkühlen nimmt die Trübung deutlich zu.
- 2) Millonsche Reaktion positiv.
- 3) Biuretreaktion positiv.
- 4) Xantoproteinreaktion positiv.
- 5) Salzsäure und Salpetersäure (10%): Weisse Trübung bei Kälte. Bei Siedehitze teilweise löslich. Beim Abkühlen Verstärkung der Trübung.
- 6) Schwefelsäure (10%): Ebenso.
- 7) Phosphorsäure: Keine Trübung.
- 8) Kohlensäure: Keine Trübung beim Einleiten in den Harn.
- 9) Tannin und Essigsäure: Starker Niederschlag.
- 10) Ammonsulfat: Spärlicher Niederschlag bei der Halbsättigung mit Ammonsulfat.
- 11) Magnesiumsulfat: Keine Ausfällung.
- 12) Kochsalz: Mit gesättigter Kochsalzlösung keine Trübung.
- 13) Essigsäure und konzentrierte Kochsalzlösung: Niederschlag positiv.
- 14) Essigsäure-Ferrocyankalium: Der Niederschlag löst sich beim Kochen.
- 15) Essigsäure und Sulfosalicylsäure: Niederschlag bei 100°C teilweise löslich und beim Abkühlen wieder erscheinend.
- 16) Alkohol: Ausfällung positiv.
- 17) Natronlauge, dann mit Essigsäure neutralisiert: Starker Niederschlag.
- 18) Natronlauge und Bleiacetat: Spärlicher brauner Nieder-

schlag beim Kochen.

19) Milchsäure: Keine Trübung.

20) Trichloressigsäure: Niederschlag löst sich beim Kochen, die Trübung nimmt beim Abkühlen zu.

21) Adamkiwicz's Reaktion: Positiv.

22) Dialyse: Dialysiert nicht.

Aus diesem Resultat geht hervor, dass er nur auf Wärme eine besondere Reaktion aufweist, sonst unterscheidet er sich nicht vom gewöhnlichen Eiweisskörper. Er zeigt nämlich im allgemeinen gewöhnliche Fällungs-bzw. Farbenreaktionen.

Die chemischen Eigenschaften weichen aber nach den klinischen Fällen einigermassen voneinander ab. Es ist fraglich, ob es sich um eine einfache Substanz handelt. Wahrscheinlich gesellt er sich der anderen Albuminurie hinzu. Nächst dem untersuchte ich die Wirkung des Harnstoffs auf die Ausfällung dieses Körpers beim Erwärmen.

Harnmenge in cem	Harnstoff- menge (50%) in cem	Aqua distillata in cem	Bei 60°C erwärmt	Bei 100°C erwärmt	Abkühlung
2	0	2.0	starke Trübung mit Nie- derschlag	fast total aufhellt	etwas getrübt
2	0.2	1.8	Trübung mit spär- lichem Nie- derschlag	total aufhellt	getrübt
2	0.4	1.6	Trübung mit spär- lichem Nie- derschlag	aufhellt	getrübt
2	0.5	1.5	schwache Trübung	aufhellt	klar
2	0.6	1.4	klar	klar	klar
2	0.7	1.3	klar	klar	klar
2	0.8	1.2	klar	klar	klar
2	2.0	0	klar	klar	klar
	Harnstoff- menge (gesättigt)				
2	0.2	1.8	klar	klar	klar
2	0.4	1.6	klar	klar	klar
2	0.5	1.5	klar	klar	klar
2	0.6	1.4	klar	klar	klar
2	0.7	1.3	klar	klar	klar
2	0.8	1.2	klar	klar	klar

Aus dieser Tabelle ist es ersichtlich, dass parallel der Harnstoffkonzentration die Gerinnung beim Erwärmen auf 55°C deutlich gehemmt wird.

Die Herstellung des Eiweisskörpers.

Früher hatte man den Harn mit zwei Volumina gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt und aus dem dadurch abgefällten Niederschlag den Eiweisskörper im krystallisierten Zustande isoliert. In unserem Fall ist die Reaktion des Harns etwas schwach alkalisch, es wird mit Ammonsulfatlösung ein nur spärlicher Niederschlag gebildet. Also stellte ich dieses Eiweiss nach Hopkins Verfahren dar. Ich erwärmte den mit Essigsäure angesäuerten Harn auf 55°C. Dabei stellte sich flockiger voluminöser Niederschlag ein, welchen ich zentrifugierte. Dieser Niederschlag wurde mit destilliertem Wasser wiederholt gewaschen und zentrifugiert, dann mit Alkohol einige Male gewaschen. Schliesslich habe ich diesen Niederschlag mit Ather gewaschen und getrocknet. Diese Substanz wurde im Exsikator aufbewahrt und dann pulverisiert. Diesen Körper habe ich chemisch analysiert.

Gesamt-N des Eiweisskörpers	13.75%
	13.50%
Aschengehalt	5.043%
Gesamt-Schwefelgehalt	0.41%
	0.30%

1.305 g Eiweiss wird in 100cc. N/10 Natronlauge gelöst und das Drehungsvermögen wird polarimetrisch bestimmt.

$$[\alpha]_D = -95.78$$

Isoelektrischer Punkt desselben Eiweisskörpers. Ich löste diesen in N/50 Natronlauge und versetzte 10 cc dieser Lösung mit verschiedenen Mengen der N/10 Essigsäure- und N/10 Natronlauge. Das Gesamtvolumen betrug in diesem Fall 50 cc. Auf solche Weise bekam ich die verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen, die hierbei nach der Gaskettenmethode bestimmt wurden. Unterhalb von Ph 4.72 fand merkwürdigerweise weisser Niederschlag, dagegen oberhalb davon kein Niederschlag statt. Ich hatte den Stickstoffgehalt des Niederschlags resp. des Filtrates quantitativ bestimmt und danach die Wasserstoffionenkonzentra-

tion des Filtrates bestimmt. Man gab an, dass der isoelektrische Punkt des Bence-Jones'schen Eiweisses zwischen Ph 4.0–5.5 liegt. Nach meinem Resultat ist der isoelektrische Punkt des Bence-Jones'schen Eiweisskörpers 4.72.

	Stickstoffgehalt des Niederschlags von 100 ccm in mg	N-gehalt des Filtrates von 100 ccm	Ph des Filtrates
I	5.043	3.363	4.04
II	4.203	4.203	4.16
III	4.203	4.208	4.37
IV	3.922	4.484	4.61
V	3.362	5.044	4.72
VI	0	8.406	5.14
VII	0	8.406	5.67
VIII	0	8.406	6.24
IX	0	8.406	6.87

Die Stickstoffverteilung dieser Substanz hatte ich nach Lüscher's Angabe erforscht.

	I Art	II Art	III Art
Amid-N	9.03%	7.74%	6.32%
Melanin-N	3.34%	7.16%	2.59%
Diamino-N	22.03%	20.29%	26.61%
(Amino- in Diaminofraktion)	9.82%	9.17%	15.43%
Cystin-N	5.01%	4.35%	7.27%
Arginin-N	7.34%	6.00%	8.70%
Histidin-N	7.42%	9.93%	6.99%
Lysin-N	2.25%	0.01%	3.65%
Gesamt-N im Filtrat	64.60%	64.81%	65.54%
Monoamino-N im Filtrat	44.42%	51.18%	64.61%
Nonmonoamino-N	20.18%	13.63%	0.93%

Die Diaminofraktion schwankt in unserem Fall zwischen 20.29–26.61% des gesamten Stickstoffs.

Da der Schwefelgehalt hier 0.3–0.41% betrug, so ist er gegen-

über dem früher angegebenen Wert von 1.18–1.46% etwas geringer. Man hatte schon die Wirkung der Pepsinsalzsäure auf diese Substanz untersucht. Sie lieferte bei der Pepsinverdauung die gewöhnlichen Albumosen und Peptone. Magnus-Levy fand dabei sogar Protoalbumose. Da zum Versuche peptischer Verdauung Westeneys Methode zweckmässig ist, so habe ich dieselbe benutzt. 2.22 g Eiweiss liess sich mit 100 ccm künstlichem Magensaft verdauen.

	Nach 2 Stunden	Nach 4 Stunden
Protein	0	0
Metaprotein	2.44%	0
Proteose	61.38%	10.97%
Pepton	0	49.43%
Subpepton	36.72%	39.60%

Bei meinem Versuche wurde es nach vierstündiger Verdauung vollständig in Proteose, Pepton und Subpepton gespalten.

Tryptische Verdauung des Bence-Jones'schen Eiweisskörpers.

0.5 g Eiweiss 0.2 g Trypsin (Grübler) und 0.1 g wurden in 15 ccm Wasser gelöst.

Stunden	Amino-N (in mg) für 100 ccm Lösung	
0	44.40	44.40
1	—	100.80
2	93.75	172.80
3	180.00	196.80
4	187.50	196.80
5	—	196.80
6	192.50	—
24	251.30	253.50
48	259.50	256.52

Durch Trypsin wird 41% des gesamten N nach 48 stündiger Verdauung als Aminostickstoff gespalten, welchen ich nach Van Slyke's Methode quantitativ bestimmte.

Über die Herkunft und die Bildungsstätte dieses Körpers kann man nichts Bestimmtes sagen, weil er nicht dem bekannten in der Nahrung enthaltenen, dem bei der Verdauung entstehenden resp. im Tierkörper enthaltenen Eiweiss entspricht. Seine Menge schwankte auch nach den Angaben verschiedener Autoren zwischen $\frac{1}{4}$ – $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ – $\frac{1}{2}$, 4–6% weiter 1–2–2.4%. Bald bemerkte man sogar Tagesausscheidung von 6.7–8–12 g. Kann solche massenhafte Ausscheidung der Knochenmarkveränderung resp. Geschwülsten zugeschrieben werden? Es ist unmöglich zu denken, dass solche überschüssige Menge des Eiweisses aus Myelom oder Osteosarkom selbst her stammt. Bis zu einem gewissen Grade stammt dieses Eiweiss in der Tat vom Myelom, resp. Osteosarkom. Aus diesem Grund war Magnus-Levy's Auffassung, dass dies meistens direkt oder indirekt aus dem Nahrungseiweiss entsteht. Weber und Allard behaupteten jedoch die Unabhängigkeit von der Art und der Menge des Nahrungseiweisses und der Ausscheidung desselben. Nach Krauss sollte der Paralellismus zwischen der Ausscheidung desselben und dem Eiweissumsatz, d.h. Eiweisszufuhr vorhanden sein. Nach Abderhalden gehört es dem Gewebeeiweiss, welches unumgebaut in die Blutbahn gelangt und dann als körperfremd, resp. plasmafremd durch die Nieren ausgeschieden wird. Decastelle hielt als Vorbedingung der Ausscheidung die Nierenschädigung. Die geschädigten Nieren lassen den Eiweisskörper leicht passieren. Thanhauser beschrieb die Bence-Jonnes'sche Albuminurie mit dem nephrotischen Nierenschwund. Diese Nierenschädigung wird durch die toxische Wirkung des plasmafremden Eiweisskörpers verursacht.

Harnmenge in cem	2100	5200	5800	2600	4300	3500
Harn eiweissgehalt %	7.0	4.5	6.0	14.0	8.0	9.0

In unserem Fall betrug die Tagesausscheidung des Harn-eiweisses von 14.7 bis 34.8 g; aber es gelang mir nur relativ spärliche Mengen des Bence-Jones'schen Eiweisskörpers aus Tagesharn darzustellen. Deshalb dürfte der Tagesharn nur eine mässige Menge des Serumeiweisses enthalten. Infolge nephrotischer Nieren-

schädigung kann das Serumalbumin gleichzeitig im Harn auftreten. Ich denke, dass der Bence-Jone'sche Eiweisskörper direkt, von den Knochenmarkerkrankungen z.B. Myelom Osteosarkom, Osteomalacie oder diffuser lymphadenoider Degeneration wie beim Fall Askanazy's her stammt, jedoch dabei auch das Serumalbumin sich gleichzeitig wegen der Nierenschädigung in relativ grösserer Menge im Harn zeigt.

Schliesslich spreche ich Herrn Prof. Dr. T. Sasaki, Direktor dieses Krankenhauses und Herrn Dr. K. Mori meinen besten Dank aus.

LITERATUR.

- Abderhalden und Rostoski (1905): Zeitsch. f. physiol. Chem., **46**.
Hopkins and Savory (1911): Journ. of physiol. **42**.
Lüscher (1922): Biochem. Journal, **16**.
Magnus-Levy (1900): Zeitsch. f. physiol. Chem., **30**.
Wasteneys and Borsook (1924): Journal of biol. chem., **62**.
Wilson (1923): Journal of biol. chem., **56**.

CONTRIBUTION TO THE MEASUREMENT OF COLLOID-OSMOTIC PRESSURE BY KROGH AND NAKAZAWA'S METHOD.

By

HIROSHI NAGAOKA.

(From the 1st Division of the Institute of Physiology, Kyoto Imperial
University. Director: Prof. E. Shoji.)

(Received for publication, April 1, 1935)

INTRODUCTION.

The devising by Krogh and Nakazawa in 1927 of two convenient methods for measuring the colloid-osmotic pressure of a biological solution of some 0.3–0.5 cc. marked a new epoch in the study of this branch of research. Of the two, the first method is generally used by Nakazawa, Meyer, Imai and others, because of its simplicity and its relatively high accuracy as compared with the methods heretofore used. In order to utilize this method in our animal experiments on haemorrhage, several preliminary tests on the measurement as well as on the properties of haemoglobin solution and blood serum were carried out.

METHODS.

Materials: The blood serum used as material is prepared by defibrinating horse blood in the usual manner. The haemoglobin solution is prepared by means of an isotonic phosphate buffer solution of pH 6.7. The procedure is as follows: Corpuscles collected from defibrinated horse blood are thoroughly washed with the isotonic and isoelectric KCl-phosphate buffer solution ($\Delta = -0.56^{\circ}\text{C}$ by the Beckmann measurement and pH 6.7 by the glass electrode method), and then are brought into perfect haemolysis by repeating the treatment of successive freezing and thawing, forming a paste of oxyhaemoglobin crystals. To eliminate impurities, this paste is washed four times with a small amount of the KCl-phosphate

buffer solution mentioned. Then the paste that remains is dissolved in a large volume of the buffer solution, and the supernatant portion is collected by centrifuging. This is the haemoglobin solution used in the present experiments.

Collodion membrane: The membrane is prepared from a collodion solution made by concentrating "collodion" (Ph. Jap. IV) to about one-third of its original volume. The original collodion is too dilute, as it creases on its surface when the film of the solution is dried during the preparation of the membrane. The collodion thus concentrated is spread on the surface of a glass rod 4 mm thick by immersing the rod in the collodion solution, and it is dried by rotating the rod slowly at the room temperature for 2 minutes. Then this is immersed for a second time in the collodion solution and dried again for 5 minutes.

Krogh and Nakazawa adopted Zsigmondy's method for examining the permeability of the membrane. This method compares the permeability of the membrane with the time in minutes (called minute-numbers) necessary for passing 100 cc. of water through 100 cm² of the membrane under 1 atmospheric pressure. According to them, the most suitable permeability for measuring the colloid-osmotic pressure of serum is within 120-330 minute-numbers. Prof. Katsu, however, is of the opinion that, for examining the permeability of the membrane, it is more reasonable to examine its membrane potential rather than to use Zsigmondy's minute-numbers, and that a membrane which has a standard membrane potential of less than 5 millivolts is most suitable for measuring the colloid-osmotic pressure of serum. The standard membrane potential is the potential of a membrane of which the inside is brought into contact with 1/10 mol KCl and the outside with 1/100 mol KCl solution. In the present study, we made use of membranes with a standard membrane potential of 2-5 millivolts.

Preservation of the membrane: Krogh and Nakazawa used to preserve the membranes in a 0.025% trypanflavin-Ringer solution. We, however, preserved them simply in distilled water, as we were afraid of some possible change in their permeability by

tryptaflavin adhering to them.

Procedure of the experiments: When the horse serum was applied as the material inside the membrane, then a 1% NaCl solution was used as the outer liquid. When the haemoglobin solution was put inside, then the KCl-buffer solution mentioned above was used as the outer liquid. Each osmometer was immersed separately in a thermostat at 25°C. As to the technique of the measurements and their calculation, Krogh and Nakazawa's method was followed.

EXPERIMENTAL RESULTS AND DISCUSSION.

I. Time necessary for the equilibration of the colloid-osmotic pressure.

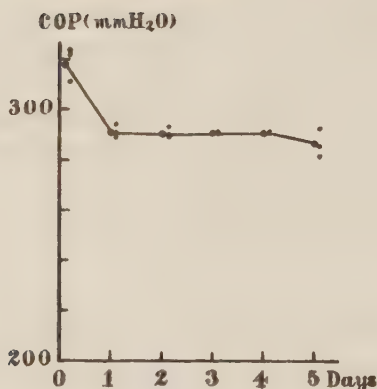
Exp. I. The colloid-osmotic pressure of the horse serum was measured at 25°C after two and a half hours, 1, 2, 3, 4 and 5 days, each measurement being carried out parallel with 3 osmometers. The results obtained are summarized in Table I (cf. Fig. 1).

TABLE I.

No. of osmometer	Colloid-osmotic pressure (mm H ₂ O), measured after					
	2.5 hours	1 days	2 days	3 days	4days	5 days
1	311	291	289	291	290	285
2	322	289	290	290	290	281
3	324	294	293	291	291	292
Mean	319.0	291.3	290.6	290.6	290.3	286.0

Krogh and Nakazawa reported that the colloid-osmotic pressure of serum measured after 6–8 hours at the room temperature differed by usually less than 10 mm water pressure from that measured after 16–24 hours at the same temperature. They argued that further fall of the pressure even after 24 hours might be due to an aggregation of protein molecules by infection. In the experiments made in 1925 by Adair, who measured the colloid-osmotic pressure of haemoglobin solution at 0°C, the osmotic pressure became practically stable after 1–2 days, remaining constant for

Fig. 1.



many days afterwards. In the present experiment also, the colloid-osmotic pressure became practically stable after 24 hours, and the margins of the pressures measured in the different osmometers reached the minimum after 3 days, showing that a perfect equilibrium had been attained. After 5 days, however, these margins became greater and there was a tendency for their equilibrium to be destroyed. This fact is to be considered as being due to the denaturation of the serum protein by infection. Thus we may conclude that the colloid-osmotic pressure measured by the above mentioned method equilibrates perfectly after 3 days, but that practical equilibrium is already attained after 24 hours. Accordingly, as the accurate value of the colloid-osmotic pressure, we took the pressure as measured after 24 hours.

II. Experimental error of Krogh-Nakazawa's method.

Exp. II. The colloid-osmotic pressure of one and the same horse serum was measured at 25°C after 3 hours and 24 hours respectively with 10 different osmometers. The results are summarized in Table II. As is shown in this table, the colloid-osmotic pressure measured after 3 hours were not yet perfectly equilibrated and their mean value was 306 mm H₂O, with the standard deviation (δ) of 5.05 mm H₂O. The mean of the pressures measured after 24 hours when they may be considered to be practically in a

TABLE II.

No. of osmometer	COP (mm H ₂ O), measured after		Difference
	3 hours	24 hours	
1	306	285	21
2	304	293	11
3	311	289	22
4	312	295	17
5	311	290	21
6	306	280	26
7	305	290	15
8	308	287	21
9	302	285	17
10	294	279	15
Mean	305.9	287.3	18.6
δ	5.05	4.82	

state of equilibrium was, however, 287 mm H₂O, and their standard deviation was 4.82 mm H₂O, thus not differing greatly from that given by the experiment of Krogh and Nakazawa, i.e. 4.1 mm H₂O. Thus, the experimental error decreases as equilibrium is approached. The differences between the pressures measured after 3 hours and the corresponding pressures measured after 24 hours, however, were nearly constant, so that we may conclude as follows: first, if we wish to compare the relative colloid-osmotic pressures of several solutions, we are able to make fairly accurate comparisons with measurements obtained at any time between 3 and 24 hours; and second, the margins of colloid-osmotic pressures measured after 24 hours may be due to differences in the permeability of each membrane rather than to errors in measurement.

III. Relation between the colloid-osmotic pressure and the temperature of the solution.

Exp. IIIa. In this case, the isotonic and isoelectric haemoglobin phosphate buffer solution was used as the material. Six osmometers mounted with the haemoglobin solution mentioned were

separated into 3 groups, each consisting of two osmometers. The three groups were measured for colloid-osmotic pressure after 6 hours at 0.4, 21.6 and 33.6°C respectively. The results are summarized in Table IIIa. The results show that the following relation,

$$P = KT,$$

where P is the osmotic pressure, and T the absolute temperature, holds practically good.

TABLE IIIa.

Nos. of experiments	Temp.	Mean of COP, measured after 6 hours	COP, calculated from $P = KT$, $K = 0.424$ at 21.6°C	Difference
2	0.4°C	117.5 mm H ₂ O	115.9 mm H ₂ O	+ 1.6
2	21.6°	125.0 "	125.0 "	—
2	33.6°	131.8 "	130.0 "	+ 1.8

Exp. IIIb. Here, horse blood serum was used as material. Twelve osmometers mounted with the horse blood serum were separated into 4 groups of 3 each. These groups were examined as to their colloid-osmotic pressure after 3 hours and 8 hours at 2, 29, 41 and 54°C respectively. The means of the pressures of these groups are summarized in Table IIIb, where the relation,

TABLE IIIb.

Nos. of experiments	Temp.	Mean of COP, measured after		COP, calculated from $P = KT$, $K = 0.975$ at 29°C	Difference
		3 hours	8 hours		
3	2°	263	258	268	- 10
3	29	303	294	294	—
3	41°	320	308	306	+ 2
3	54°	270	266	319	- 53

$P = KT$, is found to exist up to 41°C. At 54°C, however, this relation no longer holds goods, the pressure falling lower than that at 41°C. This tendency for the pressure to fall must be due to the coagulation of protein molecules by heating at the higher temperature.

Discussions of the results: It has been accepted by many authors that colloid-osmotic pressure should be measured at body temperature in order to avoid any change in the aggregate state of the colloidal particles due to temperature variations. Marraëck and Hewitt reported that the change in the osmotic pressure with a temperature deviation of from 0 to 37°C, was on the whole rather less than one would have expected, and suggested that there could be no great change in the physical state of the proteins in passing from 0 to 37°C. Krogh and Nakazawa also reported that the colloid-osmotic pressure of human blood serum and horse blood serum, as measured by their method, increased slightly when the temperature was raised, but that as the differences were within the limits of experimental error, it was better to measure the pressure at room temperature as being more convenient and having less possibility of infection. As far as we know, Imai is the first to verify the fact that colloid-osmotic pressure is proportional to the absolute temperature, i.e. $P = KT$. In the present experiment also, this relation was confirmed.

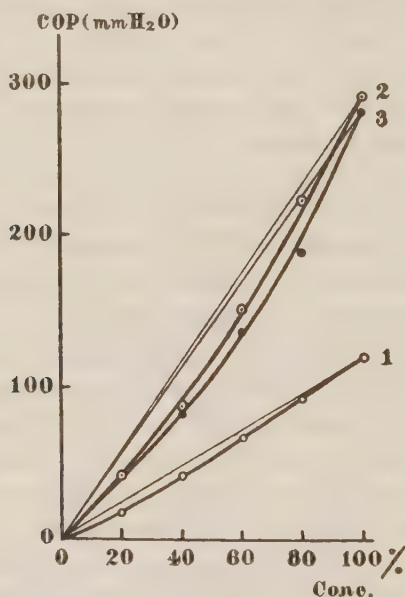
IV. Relation between the colloid-osmotic pressure and the concentration of the solution.

Exp. IVa. In order to simplify the conditions for causing changes in the colloid-osmotic pressure, the isotonic and isoelectric haemoglobin phosphate buffer solution was first used as material. Four portions of the same haemoglobin solution mentioned before were diluted with the isotonic and isoelectric KCl-phosphate buffer solution to 80, 60, 40 and 20% of their volume respectively. Each of these diluted solutions as well as the original solution were examined as to their colloid-osmotic pressures at 25°C, each with two osmometers. The various means of the pressures measured after 24 hours are summarized in Table IV (cf. Fig. 2, curve 1). As is shown in this table, the colloid-osmotic pressure decreases more rapidly than is proportional to the concentration.

Exp. IVb. Next, horse blood serum was used as material. As in the former experiment, four portions of the same horse blood serum were diluted with 1% NaCl solution to 80, 60, 40 and 20%

TABLE IV.

Conc. of soln.	Isotonic Hb-buffer soln, diluted with isotonic buffer solution		Horse serum, diluted with physiological NaCl soln.			Horse serum, diluted with distilled water		
	Nos. of exps.	Mean of COP, measured after	Nos. of exps.	Mean of COP, measured after		Nos. of exps.	Mean of COP, measured after	
		24 hours		2.5 h	22 h		5 h	19 h
100 %	2	120	3	319	291	3	294	282
80 ..	2	92	3	240	223	3	216	183
60 ..	2	66	3	163	151	3	154	136
40 ..	2	41	3	94	86	3	88	83
20 ..	2	17	3	43	42	3	50	47



1. Haemoglobin buffer solution diluted with isotonic and isoelectric KCl-solution.
2. Horse blood serum diluted with isotonic NaCl-solution.
3. Horse blood serum diluted with distilled water.

of their volume respectively. Each of these diluted solutions as

well as the original solution were examined, as before, each with 3 osmometers. The means of the pressures measured after two and a half hours and 22 hours are summarized in Table IV (cf. Fig. 2, curve 2). The results are the same as they were in the former experiment.

Exp. IVc. Another experiment, similar to Exp. IVb, was carried out with the horse blood serum diluted with distilled water. The means of the pressures measured after 5 and 19 hours are summarized also in Table IV (cf. Fig. 2, curve 3). The results are the same as in the former two cases.

Discussion: It has already been confirmed by many authors and is generally accepted that colloid-osmotic pressure decreases more rapidly than is proportional to the concentration. Regarding this fact, the general opinion is as follows: van't Hoff's relation should hold, if the number of colloidal particles be the sole determining factor of the colloid-osmotic pressure as measured. In reality, however, this relation does not hold, because both the membrane equilibrium and the swelling pressure influence the osmotic pressure. Of these two latter factors, the former, i.e. the action of the membrane equilibrium has been discussed exhaustively by Donnan, while the latter, i.e. the action of the swelling pressure, has not yet been quite satisfactorily elucidated. According to Donnan, the following relation governs the pressure P_1 , which is generated by the excess of crystalloid in the colloidal solution:—

$$P_1 = RT \frac{C_1^2}{C_1 + 2C_2}$$

where C_1 is the concentration of the ionized colloidal particles in the solution put on the one side of the membrane, and C_2 the concentration of the crystalloid-solution on the other side. T is the absolute temperature, and R the gas constant. Then the pressure P , which is the total colloid-osmotic pressure, is given by

$$P = RTC + RT \frac{C_1^2}{C_1 + 2C_2}$$

where C is the total concentration of the ionized and not-ionized colloidal particles. As a matter of fact, however, it is difficult to

measure the concentration of the ionized colloid (C_1), so that the examination of the accuracy or otherwise of this equation by experiment is a matter of difficulty.

Taking into account the swelling pressure which exists in sol, Ostwald gave the following equation for the osmotic pressure P of a colloidal solution:—

$$P = P_0 + P_q = RTC + KC^n,$$

where P_0 is the osmotic pressure due to the number of colloidal particles, P_q the swelling pressure, C the concentration of the swelling body, and both K and n are constants. He maintained on the basis of his experimental results that the value of n was nearly 2. Thus we can rewrite his equation in the form $P = AC + BC^2$ where both A and B are constants. Adair, who examined the propriety of this equation by experiments with a haemoglobin solution, and Thomas and Murray, who also examined it in regard to an arabic acid, supported Ostwald's view, which agreed with the results of their experiments.

Haller disapproved of van't Hoff's equation in consideration of the oscillation- and rotation-movements which colloidal particles have in addition to their translatory motion, which was thought to cause the usual osmotic pressure, and developed the following equation:—

$$P = RTC + RT(0.46 N_L \nu \phi) C^2$$

where ν is the degree of freedom of oscillation, and ϕ its amplitude. In this equation, however, the values of ν and ϕ are constants when the temperature remains unchanged. Accordingly, we can reduce his equation to $P = AC + BC^2$ at constant temperatures, this being quite the same as Ostwald's equation mentioned above.

Now, we must examine whether or not this equation holds good in regard to our experimental results. For this purpose, the data of exp. IVa are taken. On applying to the equation the measured values of P for 100% and 80% concentration, the constant A and B are computed to be 0.95 and 0.0025 respectively. Then, by applying these values to the equation, the colloid-osmotic pressures P are calculated for other concentrations. The results are given in

Table V. We see that both the measured and the calculated

TABLE V.

Conc. (%)	COP observed (mm H ₂ O)	Ostwald and Haller $P = AC + BC^2$		Verney $P = (Pb + K)C$		Fishberg $1/1^2 = e^{aV}$
		Calculated	Difference	Calculated	Difference	$a \log e$
100	120	120	—	120	—	92.08
80	92	92	—	92	—	82.90
60	66	66	0	66	0	70.83
40	41	40	+1	42	-1	55.49
20	17	20	-3	20	-3	35.39

colloid-osmotic pressures agree to a satisfactory degree. Thus the applicability of the equation is confirmed.

On the other hand, Verney proposed on the basis of his experiments the following empirical equation:—

$$P(v - b) = K,$$

where v is the reciprocal of the colloid-concentration, and K a constant. b also is a constant empirically determined by the author. Krogh and Nakazawa reported that Verney's equation did not agree with their experimental results, and argued that this discrepancy was perhaps due to the high pressure, caused by the striking decrease in free water in a solution which had been concentrated down to about half or one-third of its volume.

Now, Verney's equation may be rewritten

$$P = (Pb + K)C,$$

where C is the colloid-concentration. By applying the results of the same experiment, i.e. Exp. IV a, to this equation in the same way as above, the constants K and b were computed from the data of the 100% and 80% concentrations, and 0.986 and 0.00178 respectively were obtained. Then by applying these values to the equation, the osmotic pressures, P , for other concentrations were calculated. In this instance also, a close agreement of both the measured and the calculated values was seen.

Fishberg assumed that the rate of change of the pressure

with respect to the colloid-concentration was proportional to the actual pressure, so that the relationship between the concentration of colloid and the osmotic pressure of the colloidal solution would be expressed by the equation

$$\frac{1}{P} = e^{ar},$$

where v is the reciprocal of the concentration, and a a constant dependent upon the particular solution. In his report, a close approximation of his equation to his experimental results was given. When, however, we apply our results to his equation as in the two former cases, we find that the value of $a \log e$, which is considered to be a constant, decreases strikingly with the decrease in the concentration and does not result in a constant at all (cf. Table V).

In short, we see that the equations of Ostwald and Haller and Verney agree more or less closely with our experimental results, while that of Fishberg does not hold good.

As Verney's equation was empirically introduced, some theoretical considerations may be adduced. The form of the equation, $P(v-b)=K$, suggests the universal gas law as applied to the real gas, the corrected volume, $v-b$, representing the space allowed to gas molecules to move freely.

Now in a colloidal solution, the universal gas law may be rewritten to form van't Hoff's equation, $P = RTC$, where P represents the colloid-osmotic pressure, and C the concentration or the number of gram molecules per litre of the colloidal particles. The number of gram molecules of the freely movable solvent is given by

$$\frac{1-vC}{V} - kC,$$

where v and V represent the volume of 1 gram molecule of the colloidal particles and that of 1 gram molecule of the solvent respectively. k is the number of gram molecules of the fixed solvent combined with 1 gram molecule of the colloidal particles, so that kC is the total number of gram molecules of fixed solvent in 1 litre of the solution.

• Taking the movable and fixed solvents into account, van't Hoff's equation will be modified as follows:—

$$P = RT \frac{C}{C + \frac{1-vC}{V} - kC}$$

$$= RT \frac{VC}{1 - (v - V + kV)C}$$

Hayashida of our Institute was able to show that the non-solvent space of the horse blood serum increased when it was diluted with hypotonic KCl-solution, and especially with distilled water, but that this increase in the non-solvent space became less as the concentration of the solution added approached that of the undiluted serum. In Exp. IV a and Exp. IV b, we took the solutions which were isotonic with the inner liquids as the outer liquids, so that k is a constant, and therefore $v - V + kV$ in the above mentioned equation is a constant, which we will represent by b . Then the above equation when rewritten becomes

$$P = \frac{VRTC}{1 - bC}$$

or

$$P = (Pb + K)C,$$

where K or VRT is also a constant when the temperature remains unchanged. The latter equation is the same as Verney's equation mentioned above.

Thus Verney's equation was deduced theoretically from van't Hoff's equation by introducing the idea of the non-solvent space.

Now, we can expand the equation, $P = \frac{VRTC}{1 - bC}$, as follows:—

$$P = VRTC + bVRTC^2 + \dots + b^{m-1} VRTC^m.$$

P , the colloid-osmotic pressure, has a limited value, so that the right side series of the equation is convergent, i.e. the greater m is, the smaller the value of $b^{m-1} VRTC^m$ becomes. If we omit the third term and everything under this, we get the equation

$$P = VRTC + bVRTC^2,$$

or

$$P = AC + BC^2,$$

where both A and B are constants dependent on particular conditions. This is the same as the equations of Ostwald and Haller. Accordingly, it is conceivable that the general formula of all the equations mentioned above is

$$P = \frac{VRTC}{1-bC}$$

$$= \frac{aTC}{1-bC},$$

where $a = VR$ is a constant.

It has already been mentioned in discussing the membrane equilibrium, that the real osmotic pressure of the colloidal solution was theoretically the sum of the following three factors: the osmotic pressure determined by the number of colloidal particles, that caused by the action of the swelling pressure, and that caused by the membrane equilibrium. When we calculated the colloid-osmotic pressure neglecting the pressure generated by the Donnan membrane equilibrium, we found it agreed closely with our experimental results so that the equation, $P = \frac{aTC}{1-bC}$, holds good with regard to the experiment.

The applicability of this equation was also verified with regard to Exp. IV b and Exp. IV c, in which the horse serum was diluted with the isotonic NaCl-solution or distilled water respectively. The close agreement of the calculated and the observed data may be seen in Table VI.

As was pointed out above, the equation, $P = \frac{aTC}{1-bC}$, is applicable in general to colloidal solutions within the limits of experimental error, whether the solution is diluted with the isotonic salt solution or with the hypotonic one.

TABLE VI.

Conc. (%)	COP (mm H ₂ O) of horse serum,					
	diluted with physiological NaCl solution. A = 0.00281 B = 2.092			diluted with distilled water. A = 0.00374 B = 1.764		
	Observed	Calculated	Difference	Observed	Calculated	Difference
100	291	291	—	282	282	—
80	223	216	+7	189	201	-12
60	151	151	—	136	136	—
40	86	94	-8	83	83	0
20	42	44	-2	47	38	+9

A and *B* were calculated from the data for 100% and 60% concentrations.

SUMMARY.

1. The colloid-osmotic pressure of horse blood serum was measured by Krogh and Nakazawa's method, using a collodion membrane with a standard membrane potential of 2-5 millivolts. The colloid-osmotic equilibrium between the inner and outer liquids of the osmometer is practically attained after 24 hours.

2. In order to compare the relative colloid-osmotic pressures of several solutions, one is able to compare with fair accuracy the pressures measured at any time after between 3 and 24 hours.

3. The fact that the colloid-osmotic pressure is proportional to the absolute temperature, which was reported by Imai of Professor Katsu's laboratory, is confirmed.

4. The colloid-osmotic pressure decreases more rapidly than is proportional to the concentration. The relationship between the colloid-concentration and the osmotic pressure of colloidal solutions is expressed by the general formula

$$P = \frac{aTC}{1-bC},$$

where *P* is the colloid-osmotic pressure, *C* the colloid-concentration, *T* the absolute temperature, and *a* constant. *b* is the value which may be considered to be practically a constant, though

theoretically it is variable with the change in the non-solvent space of the solution. This general formula includes the equations hitherto put forward by Ostwald, Haller, and Verney. The applicability of the equation was verified by experiments.

REFERENCES.

- Adair (1925): Proc. Roy. Soc. London A, **109**, 292.
Adair (1929): ditto, **126**, 16.
Donnan (1911): Zeitschr. f. Elektrochem., **17**, 572.
Fishberg (1929): J. of Biol. Chem., **81**, 205.
Haller (1929): Kolloid-Z., **49**, 74.
Hayashida (1933): J. of Biochem., **18**, 107.
Imai (1934): Jap. J. Med. Sci. III Biophysics, **3**, 2.
Krogh and Nakazawa (1927): Biochem. Z., **188**, 241.
Marrack and Hewitt (1927): Biochem. J., **21**, 1129, and (1929), ditto, **23**, 1079.
Meyer (1932): Ergebn. d. Physiol., **34**, 18.
Ostwald (1919): Kolloid-Z., **24**, 7, and (1929) ditto, **49**, 60.
Thomas and Murray (1928): J. of Physic. Chem., **32**, 676.
Verney (1926): J. of Physiol., **61**, 319.

ADDENDUM: After this paper was sent to the editor of this journal, a recent paper of Grönwall (1935), Biochem. Z., **276**, 223, has come to our notice in which it is maintained that the Fishberg equation is apparently applicable only when the protein concentration of the serum is restricted to a certain low range.

檢

印



Contents

No. 2, September, 1935.

YAMASAKI, Fujito. Beiträge zur Embryochemie der Amphibien. VIII. Oxydationsvorgänge im Riesensalamanderei	181
TAKAMATSU, Makoto und KAMACHI, Tatsumi. Beiträge zur Embryochemie der Amphibien. IX. Über das Vorkommen des Harnstoffes und der Harnsäure im bebrüteten Riesensalamanderei	185
KAMACHI, Tatsumi. Zur Kenntnis des Kalk- und Phosphorstoffwechsels im Hühnerembryo	189
KAMACHI, Tatsumi. Zur Kenntnis der Histidinbildung aus dem Arginin im bebrüteten Hühnerei	199
TAKAMATSU, Makoto. Zur Kenntnis der Embryochemie des Hynobius	203
KUMON, Teki. Über die Entgiftungsvorgänge im Kaninchenorganismus bei B-Avitaminose	213
TSUNOO, S., TAKAMATSU, M., KAMACHI, T. u. IMAIZUMI, M. Fermentwirkung im Vogelorganismus bei B-Avitaminose	225
IWASAKI, Takesi. Über die Extraktivstoffe des Muskels bei Riesensalamandern (<i>Megalobatrachus Japonicus</i>) im Winterschlaf	233
YAMASAKI, Kazumi. Über einige Choleinsäuren	243
TATEISHI, Chikara. Über die Zuckerausscheidungsschwelle des Kaninchens bei Zufuhr von Tonsillenextrakt	251
KAMIYA, Shigekazu. Über die Argininabspaltung bei dem proteolytischen Eiweissabbau	263
YOSHIMURA, Hisato. Effects of anticoagulants on the pH of the blood. (Studies on the blood pH estimated by the glass electrode method. II)	279
YOSHIMURA, Hisato. Does the pH of the blood change during clotting? (Studies on the blood pH estimated by the glass electrode method. III)	297
TAKAHASHI, Takehiko. On the mechanism of anaerobic decomposition of hexosephosphoric acids in animal tissues. III. On simple hydrolysis of hexosephosphoric acids by phosphatase	303
UDAGAWA, Hidetoshi. Über die Phosphodiesterase und die Lecithinhydrolyse	323
TOMIYAMA, Tetsuo. Chemical studies of the proteins of feedingstuffs. V. The contents of cystine and tryptophane	341
TSUTSUI, Hikoya. Über den Bence-Jonnes'schen Eiweisskörper	343
NAGAOKA, Hiroshi. Contribution to the measurement of colloid-osmotic pressure by Krogh and Nakazawa's method	351